

**Intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie am Dünndarm der Maus:  
3D-Morphologie und zelluläre Dynamik**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Tobias Fischer  
geboren am 31. Mai 1985 in Saalfeld (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andreas Gebert, Jena
2. Prof. Dr. Andreas Stallmach, Jena
3. Prof. Dr. Ina Bergheim, Wien

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22.05.2019

*„Die Natur ist so gemacht,  
dass sie verstanden werden kann.  
Oder vielleicht sollte ich richtiger umgekehrt sagen,  
unser Denken ist so gemacht, dass es die Natur verstehen kann.“*

Werner Heisenberg  
(deutscher Wissenschaftler und Nobelpreisträger)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Aufbau des Dünndarms .....	3
1.1.1 Wandaufbau .....	4
1.1.2 Schleimhaut.....	5
1.1.3 Dünndarmepithel.....	8
1.2 Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe .....	13
1.2.1 Peyer-Plaques.....	13
1.2.2 Diffus verteilte Lymphozyten .....	15
1.2.3 Intraepitheliale Lymphozyten .....	15
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>18</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1 Versuchstiere.....	19
3.2 Licht- und elektronenmikroskopische Referenztechniken.....	20
3.2.1 Organentnahme .....	20
3.2.2 Herstellung von Dünnschnittpräparaten .....	20
3.2.3 Herstellung von Ultradünnschnitten .....	21
3.2.4 Quantitative Auswertung .....	22
3.3 Intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie .....	24
3.3.1 Grundlagen der Zwei-Photonen-Mikroskopie .....	24
3.3.2 Aufbau eines Zwei-Photonen-Mikroskops .....	27
3.3.3 Laser-induzierte Anregung autofluoreszierender Gewebsstrukturen .....	28
3.4 Experimenteller Versuchsaufbau und Vorgehen.....	29
3.4.1 <i>In vivo</i> Mausmodell.....	29
3.4.2 Intravitale Markierung intraepithelialer Lymphozyten.....	32
3.4.3 Experimentelles Setup der Zwei-Photonen-Mikroskopie.....	33
3.4.4 Akquirierung von Datensätzen .....	34

3.4.5 Berechnung von Bestrahlungsintensitäten .....	35
3.4.6 Aufbereitung und Auswertung multidimensionaler Bilddaten .....	36
3.5 Statistische Auswertung .....	38
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
4.1 Morphometrie der Dünndarmschleimhaut .....	39
4.1.1 Länge und Fläche des Dünndarms .....	39
4.1.2 Vergrößerung der inneren Oberfläche .....	40
4.2 Zwei-Photonen-Mikroskopie der Dünndarmschleimhaut <i>in vivo</i> .....	47
4.2.1 Morphologie und Morphometrie des Zottenepithels <i>in vivo</i> .....	47
4.2.2 Quantifizierung von Enterozyten, Becherzellen und IEL .....	53
4.3 Dynamik intraepithelialer Lymphozyten .....	56
4.3.1 Dynamik unmarkierter Lymphozyten .....	56
4.3.2 Zell-Zell-Interaktionen markierter Lymphozyten .....	79
4.4 Kontakthäufigkeit zwischen Lymphozyten und Epithelzellen.....	87
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>89</b>
5.1 Oberflächenvergrößerung der Dünndarmschleimhaut .....	89
5.2 <i>In vivo</i> Morphologie und zelluläre Dynamik der Dünndarmschleimhaut.....	93
5.2.1 Morphologie und Morphometrie des Zottenepithels .....	94
5.2.2 Dynamik intraepithelialer Lymphozyten .....	96
5.3 Ausblick .....	103
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>IV</b>
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	IV
7.2 Tabellenverzeichnis.....	V
7.3 Filmverzeichnis .....	V
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>VI</b>
<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>VII</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AOM	Akustisch-optischer Modulator
APC	Antigen-präsentierende Zellen
Bi-GaAsP	Bi-Gallium-Arsenid-Phosphid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DC	dendritische Zellen
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
EEC	enteroendokrine Zellen
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
i.p.	intraperitoneal
IR	Infrarot
LPL	Lamina propria-Lymphozyten
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
PMT	<i>photomultiplier tube</i> (Photoelektronenvervielfacher)
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SHG	<i>second harmonic generation</i>
SNR	<i>signal-to-noise ratio</i> (Signal-Rausch-Verhältnis)
SPF	spezifiziert pathogenfrei
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TierSchG	Tierschutzgesetz
UEA-I	<i>Ulex europaeus Agglutinin-I</i>

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Dünndarmschleimhaut kommt neben einer effizienten Verdauung und Resorption von Nährstoffen aufgrund ihrer enormen Oberfläche sowie exponierten Lage zur Außenwelt eine ebenso essentielle Bedeutung in der Abwehr von unzähligen Antigenen und potenziellen Krankheitserregern zu. Quantitative Angaben über die Dimensionen der intestinalen Resorptions- und damit luminalen Angriffsfläche unter physiologischen Bedingungen sind für die Maus bislang allerdings kaum vorhanden. Im Rahmen einer morphometrischen Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit die innere Oberfläche der murinen Dünndarmschleimhaut licht- und elektronenmikroskopisch untersucht und deren Gesamtvergrößerung quantifiziert. Mithilfe geometrischer Modelle wurde dazu die Oberfläche der Zotten und Mikrovilli innerhalb verschiedener Darmabschnitte mathematisch bestimmt und, ausgehend von einem planen Darmrohr sowie den stereologisch erhobenen Daten, auf den resultierenden Gesamt-Vergrößerungsfaktor geschlossen. Unter Berücksichtigung abschnittsspezifischer Unterschiede in der Anzahl und Geometrie intestinaler Zotten und Mikrovilli konnte die absolute Fläche der Dünndarmschleimhaut der Maus mit  $0,46 \text{ m}^2$  ( $SD \pm 0,04 \text{ m}^2$ ) bestimmt werden. Durch die verschiedenen strukturellen Spezialisierungen vergrößert sich die Oberfläche der resorbierenden Darmschleimhaut in Bezug zur äußeren Oberfläche des Darmrohrs somit insgesamt um das etwa 150-fache ( $SD \pm 14,2$ ). Die Ergebnisse bieten eine repräsentative Ausgangslage zur Beurteilung der speziellen Morphometrie der Dünndarmschleimhaut unter physiologischen Versuchsbedingungen, erlaubten letztlich jedoch eine allein mathematische Annäherung an deren tatsächliche Oberfläche *in vivo*.

Zwischen den Epithelzellen in der zellulären Grenzschicht zum Darmlumen lokalisiert, gewährleisten intraepitheliale Lymphozyten die Aufrechterhaltung und Sicherstellung der Gewebshomöostase sowie epithelialen Barrierefunktion. So verhindern die IEL den initialen Eintritt ins sowie die Ausbreitung luminaler, invasiver Pathogene im Gewebe, erkennen und beseitigen degenerierte oder virusinfizierte Epithelzellen und schützen ferner vor lokalen Gewebeschäden infolge überschießender Entzündungsreaktionen. Trotz zahlreicher Untersuchungen zur funktionellen und phänotypischen Ausprägung dieser Lymphozytenpopulation sind die zugrunde liegenden Mechanismen ihrer immunologischen Überwachung und intravitalen Interaktionen mit den residenten Epithelzellen noch immer weitgehend ungeklärt. Zum besseren Verständnis der zellulären Kinetik wurde im Haupt-

teil der vorliegenden Arbeit das Migrationsverhalten der IEL im intakten Zottenepithel unter physiologischen Bedingungen *in vivo* charakterisiert und neue Einblicke in die Dynamik der immunologischen Epithelzellüberwachung an der größten Oberfläche des Organismus gewährt. Dazu wurde die komplexe dreidimensionale Morphologie der Dünndarmschleimhaut lebender, anästhesierter Mäuse mithilfe der hochauflösenden Zwei-Photonen-Mikroskopie untersucht, verschiedene Zelltypen anhand ihrer Autofluoreszenz identifiziert und die zelluläre Dynamik der IEL im Epithelverband über eine Beobachtungsdauer von Minuten bis Stunden hinweg quantifiziert. Durch die spezifische Markierung ihrer Zellmembran mit einem luminal applizierten CD103<sup>+</sup>-Antikörper konnten zudem Umriss einzelner intraepithelialer Lymphozyten sichtbar gemacht und zusätzliche Informationen über deren Interaktionen mit umliegenden Epithelzellen sowie der angrenzenden Lamina propria gewonnen werden. Auf die basale Hälfte des Epithels begrenzt, patrouillierten die IEL kontinuierlich, jedoch unterschiedlich schnell durch den epithelialen Zellverband der Zotten. Während ihrer Migration ragten die Lymphozyten fortlaufend in umliegende Zellzwischenräume und kontaktierten mit ihren zellulären Ausstülpungen und länglichen Fortsätzen durchschnittlich 4,1 ( $SD \pm 1,2$ ) neue Epithelzellen pro Minute. Ihr amöbenähnliches Bewegungsmuster oberhalb der Basalmembran beruhte dabei, gleichmäßig verteilt in allen Regionen intestinaler Zotten, auf dem Zufallsprinzip. Trotz eines numerischen Verhältnisses von Epithelzellen zu intraepithelialen Lymphozyten von 7,2 ( $SD \pm 1,4$ ) wird eine Epithelzelle statistisch etwa alle 73 sec von mindestens einem IEL kontaktiert, 99,9% der Darmepithelzellen in lediglich 12 min mindestens einmal von Lymphozyten kontaktiert. Das Migrationsverhalten intraepithelialer Lymphozyten ermöglicht somit eine kontinuierliche, flächendeckende Überwachung des Dünndarmepithels sowie eine hoch effektive immunologische Überprüfung der epithelialen Integrität in äußerst kurzen Zeitabständen. Allerdings führten neben überhöhten Bestrahlungsintensitäten auch hypoxämische *in vivo* Bedingungen zu einem signifikanten Abfall ihrer Geschwindigkeit innerhalb weniger Minuten, was auf eine spezifische Empfindlichkeit der IEL auf äußere Umgebungsfaktoren hindeutet.

Durch die gewonnenen Erkenntnisse zur Dynamik der epithelialen Immunabwehr konnten neue Einblicke in die immunologischen Überwachungsvorgänge der intakten Dünndarmschleimhaut erlangt und letztlich Grundlagen für das therapeutische Verständnis einer Vielzahl von entzündlichen Darmerkrankungen geschaffen werden.



# 1 Einleitung

Der Organismus des Menschen ist mit seiner äußeren und den inneren Oberflächen ständig potenziell schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Die Haut und Schleimhäute, die die Atemwege sowie den Verdauungstrakt auskleiden, bilden dabei eine schützende Barriere gegenüber eindringenden Krankheitserregern. Aufgrund ihrer enormen Oberfläche, der fortwährenden Besiedlung mit Mikroorganismen sowie dem Kontakt mit einer Vielzahl von körperfremden Substanzen aus der Nahrung ist vor allem die Schleimhaut des Dünndarms von essentieller Bedeutung (MOWAT UND VINEY, 1997). Neben einer hocheffizienten Resorption der verdauten und aufbereiteten Nahrungsbestandteile gewährleistet die Dünndarmschleimhaut gleichzeitig verschiedene mechanische, chemische sowie immunologische Abwehrmechanismen gegenüber unzähligen Antigenen und Mikroorganismen des Darmlumens. Da bislang nur wenig über die Mechanismen der Immunüberwachung an der inneren Darmoberfläche bekannt ist, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die intakte Dünndarmschleimhaut unter physiologischen Bedingungen *in vivo* dargestellt und immunologische Vorgänge innerhalb der zellulären Grenzschicht zum Darmlumen untersucht werden.

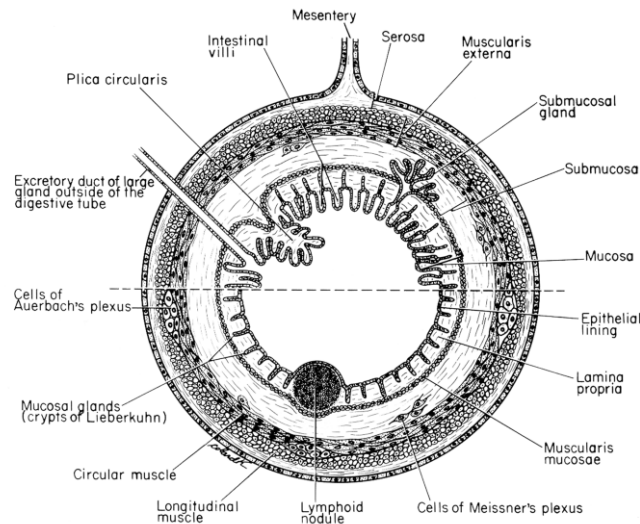
## 1.1 Aufbau des Dünndarms

Der Dünndarm ist mit seinen insgesamt drei bis fünf Metern Länge der längste Abschnitt des Verdauungstraktes beim Menschen und dient der enzymatischen Aufspaltung der Nahrung sowie der Resorption von Nährstoffen aus dem Lumen. Vom Pylorus beginnend erstreckt sich der Dünndarm in Form eines mehrfach gewundenen Schlauchs bis zum Caecum und ist dabei in die drei Abschnitte – Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Krummdarm) – untergliedert. Durch den Verlauf des Bauchfells (Peritoneum) kann anatomisch ein intraperitonealer, innerhalb der Bauch- und Beckenhöhle gelegener Anteil von einem retroperitonealen unterschieden werden. Mit Ausnahme des Duodenums, welches zum größten Teil sekundär retroperitoneal liegt, ist der gesamte Dünndarm innerhalb der Peritonealhöhle von einer Bauchfellduplikatur überzogen und lediglich über ein Mesenterium mit der hinteren Bauchwand verbunden (NEUTRA, 1988).

Der Zwölffingerdarm kann nicht nur hinsichtlich seiner Peritonealverhältnisse, sondern auch morphologisch von dem sich anschließenden, jejunalen Dünndarmabschnitt unterschieden werden. Dagegen weisen Jejunum und Ileum nur wenige histologische Unterschiede auf, sodass der Übergang zwischen diesen beiden Abschnitten ohne scharfe Grenze erfolgt (NEUTRA, 1988).

#### 1.1.1 Wandaufbau

Der Wandaufbau der verschiedenen Dünndarmabschnitte folgt einem einheitlichen Bauprinzip, wobei lediglich die intraperitoneal gelegenen, gegeneinander verschieblichen Dünndarmschlingen von einer serösen Bauchfellduplikatur, der Lamina epithelialis serosae und Lamina propria serosae, umgeben sind (Abbildung 1.1). Dem lockeren Bindegewebe der Tunica serosa und Subserosa schließt sich nach innen eine Schicht aus longitudinal sowie zirkulär verlaufenden, glatten Muskelfasern an. Durch die Anordnung der Muskelzellen zu einer äußeren Längs- (Stratum longitudinale) und inneren Ringmuskelschicht (Stratum circulare) ermöglicht die Tunica muscularis Pendel- und Segmentierungsbewegungen sowie peristaltische Kontraktionen, und somit sowohl den Transport als auch eine Durchmischung des noch relativ flüssigen Chymus über die gesamte Länge des Dünndarms (AUMÜLLER ET AL., 2014). Die an der Steuerung der Darmmotilität beteiligten Ganglienzellen des Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) liegen dabei im Stratum intermusculare zwischen beiden Muskelschichten. Innerhalb der sich lumenwärts anschließenden, bindegewebigen Tela submucosa verzweigen sich neben größeren Blut- und Lymphgefäßen auch unregelmäßig angeordnete Ganglien und Nervenfasern des Plexus submucosus (Meissner-Plexus) sowie die, auf das Duodenum begrenzten submukösen Drüsen (Brunner-Drüsen, Glandulae duodenales). Durch das Vorhandensein zahlreicher kollagener und elastischer Fasern fungiert die Submukosa hauptsächlich als Verschiebeschicht und erlaubt eine Längenänderung und Dehnung des Dünndarmrohrs sowie Bewegungen der Muskularis gegen die nachfolgende, das Darmlumen begrenzende Schleimhaut (ORBERG ET AL., 1983; GABELLA, 1987; KOMURO UND HASHIMOTO, 1990). Als innerste Wandschicht besitzt die Tunica mucosa eine essentielle Bedeutung für die Verdauung und Resorption von Nährstoffen.



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung vom Wandaufbau des Dünndarms aus vier konzentrisch angeordneten Schichten (nach BLOOM UND FAWCETT, 1975). Der Tunica serosa schließt sich nach innen die Tunica muscularis an, die im Dünndarm aus einer äußeren, longitudinal orientierten sowie einer inneren, zirkulär orientierten Schicht von glatten Muskelzellen besteht. Die bindegewebige Submukosa grenzt die Muskularis von der spezialisierten, das Lumen des Darmrohrs auskleidenden Schleimhaut ab. Die Tunica mucosa besteht ihrerseits aus einer oberflächlichen, einschichtigen Lamina epithelialis mucosae sowie der darunter gelegenen Schleimhautbindegewebs- und dünnen Muskelschicht. Zwischen einzelnen Wandschichten lagern sich mikroskopisch sichtbare Ganglien zu Nervenplexen (Plexus) zusammen. Diese Neuronenverbände beeinflussen neben der enterischen Motilität und Sekretion verschiedener Drüsen auch die lokale Durchblutung. Im fett- und bindegewebsreichen Mesenterium verlaufen sämtliche zu- sowie abführende Leitungsbahnen der intraperitoneal gelegenen Dünndarmabschnitte.

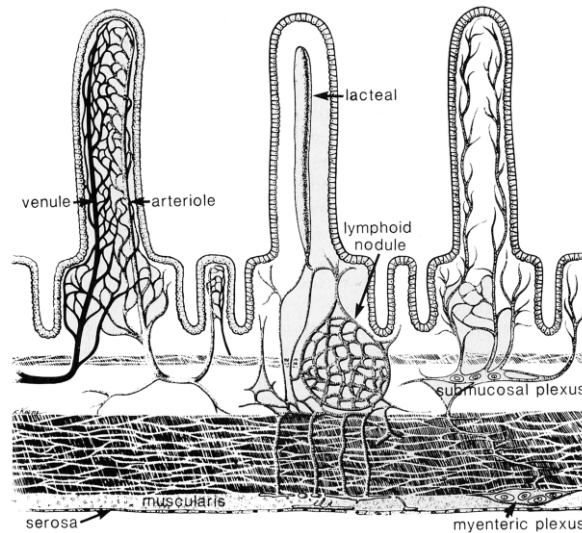
### 1.1.2 Schleimhaut

Die Dünndarmschleimhaut weist eine, in Abhängigkeit ihrer vorherrschenden funktionellen Beanspruchung bedingte, charakteristische Ausprägung bestimmter Merkmale auf. Die Tunica mucosa stellt die innere Auskleidung des Dünndarms dar und gliedert sich, ausgehend vom Lumen, in eine Lamina epithelialis mucosae, Lamina propria mucosae sowie eine Lamina muscularis mucosae. Die Lamina epithelialis mucosae besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel und enthält verschieden spezialisierte Zelltypen, deren prozentuale Verteilung in den einzelnen Dünndarmabschnitten variiert (AUMÜLLER ET AL., 2014). Wie alle Epithelien liegt auch die Lamina epithelialis mucosae einer elektronenmikroskopisch sichtbaren Basallamina auf, welche die Epithelzellen von der unmittelbar darunter liegenden Lamina propria mucosae abgrenzt (TRIER UND MADARA, 1981; KOMURO UND HASHIMOTO, 1990). Diese besteht aus lockerem Bindegewebe mit feinem

Kollagen, elastischen und retikulären Fasern, in dem sich neben den Endaufzweigungen von Blutgefäßen, Lymphkapillaren und Nerven auch zahlreiche fixe und motile Zellen der Immunabwehr befinden (TRIER UND MADARA, 1981; KOMURO UND HASHIMOTO, 1990). Die sich dem Schleimhautbindegewebe anschließende, dünne Lamina muscularis mucosae enthält glatte, einander spiralig überkreuzende Muskelfasern, deren Anordnung eine gewisse Verschieblichkeit der Tunica mucosa gegenüber der Submukosa ermöglicht (KOMURO UND HASHIMOTO, 1990). Stellenweise wird die Lamina muscularis mucosae von submukösen Drüsen sowie lymphatischem Gewebe (siehe S. 13) unterbrochen.

#### *1.1.2.1 Zotten und Krypten*

Charakteristisch für die Schleimhaut des Dünndarms ist ihre Organisation in Zotten und Krypten. Während die Zotten (Villi intestinales) als blatt- bis fingerförmige Ausstülpungen der Lamina propria mucosae ins intestinale Lumen ragen, stellen die Krypten (Lieberkühn-Krypten, Glandulae intestinales) kurze, röhrenförmige Einsenkungen des Epithels in die Schleimhaut dar (Abbildung 1.2). Die Anzahl der Krypten übersteigt, mit einem Verhältnis von 9:1, dabei die der Zotten deutlich (HAGEMANN ET AL., 1970; WRIGHT UND ALISON, 1984). In die Lamina propria mucosae eingebettet, reichen die Lieberkühn-Krypten bis zur Lamina muscularis mucosae, im Duodenum sogar bis zur Tela submucosa hinunter – und stellen als tubulöse Darmdrüsen hauptsächlich den Ort der Sekretion und kontinuierlichen Epithelregeneration dar (NEUTRA, 1988; KOMURO UND HASHIMOTO, 1990). In ihrem Vorkommen auf den Dünndarm begrenzt, dienen die Zotten dagegen vor allem der Resorption von Nährstoffen aus dem Lumen. Unter ihrer Epithelschicht verläuft ein feines Netz aus fenestrierten Blutkapillaren, deren Abflüsse sich zu einer zentral im Zottenstroma verlaufenden Venole vereinen (CASLEY-SMITH UND GANNON, 1984; NEUTRA, 1988). Die im lockeren Bindegewebe der Lamina propria mucosae beginnenden Lymphkapillaren münden in einem Sammellymphgefäß der Tela submucosa und drainieren darüber neben der interstitiellen Gewebsflüssigkeit auch aufgenommene Nahrungsfette. Rhythmische Kontraktionen, die durch vereinzelt einstrahlende Fasern der Muscularis mucosae in das Schleimhautbindegewebe ermöglicht werden, fördern den Abtransport der resorbierten Nährstoffe (COLLAN UND KALIMA, 1970). Die durch Kontraktion der Zotten hervorgerufene Schleimhautfältelung erlaubt letztlich ebenso eine Feinadaptation der inneren Darm- und somit Resorptionsoberfläche (NEUTRA, 1988; MOORE ET AL., 1989; KOMURO UND HASHIMOTO, 1990).



**Abbildung 1.2** Charakteristisch für die Dünndarmschleimhaut ist das Vorhandensein von Zotten und Krypten (nach JUNQUIERA ET AL., 1971). Die Zotten als blatt- bis fingerförmige Ausstülpungen der Schleimhaut dienen vor allem der Resorption von Nährstoffen aus dem Lumen. An ihrer Bildung sind Lamina epithelialis und Lamina propria mucosae beteiligt. Glatte Muskelfasern, die teilweise mit der Lamina muscularis mucosae verbunden sind, befähigen die Zotten zu rhythmischen Kontraktionen. Als kurze, tubulöse Drüsen münden die Krypten zwischen den Basen der Zotten und reichen bis zur Muscularis mucosae, im Bereich des Duodenums bis zur Tela submucosa. Im Gegensatz zu den Erhebungen der Tunica mucosa dienen die Krypten jedoch vor allem der Sekretion und Regeneration des Darmepithels.

#### 1.1.2.2 Oberflächenvergrößerung

Während der Passage durch das Dünndarmlumen wird der Speisebrei mit beigemengten Drüsensekreten vermischt, enzymatisch in einzelne Nahrungsbestandteile aufgespalten und diese durch Zellen des Epithels resorbiert. Um die Resorptionskapazität zu erhöhen, ist die innere Oberfläche der Schleimhaut durch Falten, Zotten sowie Mikrovilli enorm vergrößert (NEUTRA, 1988). Unter Einbeziehung des Mikrovillisaums erreicht diese beim Menschen ein Vielfaches der äußeren Körperoberfläche (HELANDER UND FÄNDRICKS, 2014). Die von der Tela submucosa aufgeworfenen Plicae circulares (Kerckring-Falten) bilden dabei zahlreiche, quer zur Längsachse des Dünndarms verlaufende Schleimhautfalten. Diese werden zum Ileum hin flacher und seltener, und verstreichen im Gegensatz zu den Falten des Magens auch bei Dehnung der Darmwand nicht (NEUTRA, 1988; LÜLLMANN-RAUCH, 2012). Durch die Aufwerfungen der Mukosa und Submukosa ins Lumen wird die innere Darmoberfläche beim Menschen von anfänglichen  $1\text{--}1,5\text{ m}^2$  auf etwa  $2,5\text{--}4,5\text{ m}^2$  vergrößert (WELSCH ET AL., 2012). Den ringförmigen Schleimhautfalten selbst sitzen pro  $\text{mm}^2$

10–40 Zotten auf (KULENKAMPFF, 1975; NEUTRA, 1988). In ihrer Länge und Form innerhalb des Dünndarms variierend, vergrößern die Zotten als Ausstülpungen der Lamina propria mucosae die innere Oberfläche zusammen mit den intestinalen Krypten um das 6- bis 14-fache (TRIER UND MADARA, 1981; WELSCH ET AL., 2012). Eine weitere, nochmals etwa 14- bis 40-fache Vergrößerung ergibt sich aufgrund der speziellen Differenzierung der apikalen Plasmamembran zahlreicher Epithelzellen (TRIER UND MADARA, 1981; WELSCH ET AL., 2012). Deren lumenwärts gerichtete Epithelzelloberfläche ist dabei zusätzlich mit gleichartig geformten, haarähnlichen Erweiterungen des Zytoplasmas, den Mikrovilli, versehen. Als stäbchenförmige, meist unverzweigte Ausstülpungen bilden die dicht stehenden, parallel angeordneten Mikrovilli in ihrer Gesamtheit den 1–3  $\mu\text{m}$  dicken Bürstensaum (MOOSEKER UND TILNEY, 1975; CRAWLEY ET AL., 2014).

Durch die beschriebene, mehrfach gestaffelte Gliederung in Falten, Zotten und Mikrovilli erreicht die Schleimhautoberfläche des Dünndarms beim Menschen letztlich eine Fläche von 100–200  $\text{m}^2$  (KOMURO UND HASHIMOTO, 1990; LÜLLMANN-RAUCH, 2012; WELSCH ET AL., 2012), und ermöglicht somit eine hocheffiziente Aufnahme der verdauten und aufbereiteten Nahrungsbestandteile. Die Angaben zum Ausmaß der Oberflächenvergrößerung sind jedoch bemerkenswert uneinheitlich. Während Kararli eine effektive Resorptionsfläche von rund 120  $\text{m}^2$  publizierte (KARARLI, 1995), geben andere Autoren eine innere Oberfläche von 260–300  $\text{m}^2$  (NIESS UND REINECKER, 2006), häufig sogar eine von 400  $\text{m}^2$  an (MOWAT UND VINEY, 1997; BRANDTZAEG ET AL., 1999; MACDONALD UND MONTELEONE, 2005). Neuere morphometrische Untersuchungen gehen dagegen von einer deutlich geringeren Gesamtvergrößerung von etwa 30  $\text{m}^2$  aus (HELANDER UND FÄNDRIKS, 2014). Trotz der anscheinend hohen Variabilität bildet die Schleimhaut als innere, dem Darmlumen zugewandte Wandschicht die mit Abstand größte Körperoberfläche gegenüber der äußeren Umwelt.

### 1.1.3 Dünndarmepithel

Die intestinale Schleimhaut steht in ständigem Kontakt mit der aufgenommenen Nahrung sowie der Außenwelt und stellt, bedingt durch ihre enorme Oberfläche, neben dem Hauptort der Wasser- und Nährstoffresorption auch eine entscheidende Angriffsfläche für Verdauungsenzyme, potenziell schädliche Substanzen und insbesondere eindringende, mit der Nahrung aufgenommene Mikroorganismen dar (BJARNASON ET AL., 1995; MOWAT UND

VINEY, 1997). Aufgrund der Resorptions- sowie zusätzlichen Schutzfunktion gegenüber einer Vielzahl von exogenen Noxen und Antigenen besitzt das Dünndarmepithel als zelluläre Grenzschicht der Schleimhaut zur äußeren Umwelt daher besondere Bedeutung.

Das einschichtige Epithel weist dabei in seiner Kontinuität neben abschnittsspezifischen Unterschieden auch eine charakteristische Zusammensetzung innerhalb der verschiedenen Kompartimente des Dünndarms auf. So kommen in den Zotten und Krypten z.T. unterschiedliche Zelltypen mit jeweils komplexen, morphologischen Spezialisierungen vor (TRIER UND MADARA, 1981; NEUTRA, 1988). Während sich im Drüsenepithel der Krypten zusätzlich zu intestinalen Stammzellen und undifferenzierten Vorläuferzellen bereits verschiedene exo- sowie endokrine Zelltypen wie Becherzellen und sekretorische Paneth-Körnerzellen finden, setzt sich das Oberflächenepithel der Zotten aus Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrinen Zellen (EEC) und Bürstenzellen zusammen (CHENG UND LEBLOND, 1974a; TRIER UND MADARA, 1981). Als spezialisierte Epithelzellen mit charakteristischen Mikrofalten auf ihrer apikalen Oberfläche sind M-Zellen auf das Epithel über dem Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe beschränkt (OWEN UND JONES, 1974; GEBERT ET AL., 1996).

#### *1.1.3.1 Oberflächenepithel der Zotten*

Entsprechend ihrer Fähigkeit zur Aufnahme und dem selektiven Transport von Nahrungsstoffen aus dem Darmlumen stellen Enterozyten den vorherrschenden Zelltyp im einschichtigen hochprismatischen Zottenepithel dar (NEUTRA, 1988). Watson et al. zufolge umfassen diese voll differenzierten, nicht mehr teilungsfähigen Zellen 80% aller Darmepithelzellen (WATSON UND PRITCHARD, 2000). Die lückenlos nebeneinander angeordneten Epithelzellen sind über *tight junctions*, weitere Zellkontakte und Adhäsionsmoleküle miteinander verbunden und erfüllen somit neben einer gewissen mechanischen Stabilisierung des Epithelzellverbands vor allem die Aufgabe der Aufrechterhaltung einer Diffusionsbarriere zwischen dem Darmlumen und der Lamina propria mucosae (MADARA, 1989; NUSRAT ET AL., 2000; EREZ ET AL., 2005). Ein unkontrolliertes, parazelluläres Eindringen von Makromolekülen, Mikroorganismen und Pathogenen in den Körper wird dadurch verhindert (BJARNASON ET AL., 1995). Die apikale Membran der polarisierten Enterozyten ist zusätzlich zu den dicht gepackten Mikrovilli von einer 0,1–0,5 µm dicken Schicht aus miteinander quervernetzter Glykokalyx bedeckt (MAURY ET AL., 1995; PELASEYED ET AL., 2014). Der an Glykoproteine und -lipide gebundene Kohlenhydratanteil der extrazellulären

Zellmembran dient dabei vor allem der Stabilisierung und dem Schutz der Epithelzelloberfläche, besitzt Rezeptorfunktionen und ist an der selektiven Resorption von Nährstoffen beteiligt (RAMBOURG UND LEBLOND, 1967; ITO, 1969; MACKENZIE UND DONALDSON, 1969; GRASBECK ET AL., 1979; HELENIUS ET AL., 1980). Zusammen mit spezifischen, transmembranären Ektoenzymen verhindert die Glykokalyx unerwünschte Protein-Protein-Wechselwirkungen, und schützt die Enterozyten vor mechanischen und chemischen Schädigungen sowie vor enzymatischem Selbstverdau (ITO, 1965; MUNAKATA UND YOSIZAWA, 1980; FREY ET AL., 1996; PELASEYED ET AL., 2014).

Neben den resorbierenden Enterozyten finden sich im Oberflächenepithel der Zotten mit Becherzellen, den EEC und Bürstenzellen noch weitere, verschieden spezialisierte Epithelzellen mit vorrangig sekretorischen Aufgaben. Becherzellen kommen, einzeln eingestreut zwischen den Enterozyten, in allen Dünndarmabschnitten vor, wobei sie aboral häufiger und regelmäßiger verteilt sind als im magennahen Epithel, ihre Anzahl vom Kryptengrund zur Zottenspitze prinzipiell jedoch abnimmt (MOE, 1955; TRIER UND MADARA, 1981; NEUTRA, 1988; WELSCH ET AL., 2012). Als exokrine Drüsen sezernieren die Becherzellen ein schleimiges Sekret, welches einen schützenden Flüssigkeits- und Gleitfilm auf der Darmschleimhaut bildet, den Nahrungstransport nach aboral erleichtert und die epitheliale Oberfläche vor der Wirkung der Verdauungsenzyme aus dem Pankreas schützt (TRIER UND MADARA, 1981; BANSIL ET AL., 1995; FORSTNER ET AL., 1995; KIM UND HO, 2010; LÜLLMANN-RAUCH, 2012; PELASEYED ET AL., 2014). Zusätzlich enthält das glykoprotein- und glykolipidreiche Sekret der Becherzellen antibakteriell wirkende Peptide und Proteine, welche von Kryptenepithelzellen (v.a. den Paneth-Körnerzellen) sezerniert und dem viskösen Schleim beigemischt werden, und dadurch einen direkten Kontakt der Epithelzelloberfläche mit Bakterien des Darmlumens verhindern (OUELLETTE, 2010; JOHANSSON UND HANSSON, 2011; VAISHNAVA ET AL., 2011; CHU ET AL., 2012). Die kontinuierliche Sekretion neuer Muzine sowie der Abtransport der bereits sezernierten Schleimschicht entlang peristaltischer Wellen nach aboral begünstigt zudem die schützende, antimikrobielle Wirkung (ERMUND ET AL., 2013). Die von den Becherzellen synthetisierten Muzine werden in Form von apikal konzentrierten Sekretgranula gespeichert und geben den Zellen, je nach Sekretions- bzw. Füllungszustand, so ihre typische kelchförmige Erscheinung (TRIER UND MADARA, 1981; NEUTRA, 1988).

Die enteroendokrinen Zellen sind aufgrund ihrer basalen Hormongranula und schmalen apikalen Zellpole morphologisch klar von den Becherzellen zu unterscheiden



(NEUTRA, 1988). Diese stark granulierten, pyramidenförmigen Epithelzellen gehören zum diffusen neuroendokrinen System, werden durch Änderungen des intraluminalen pH-Werts sowie durch verschiedene Nahrungsbestandteile aktiviert, und koordinieren und kontrollieren als mukosale Chemosensoren des luminalen Darminhalts daraufhin eine Vielzahl von gastrointestinalen Funktionen (BUCHAN, 1999; DOCKRAY, 2003; CUMMINGS UND OVERDUIN, 2007; MORAN ET AL., 2008; AKIBA UND KAUNITZ, 2011). Die EEC umfassen mindestens 15 Subtypen, stellen mit weniger als 1% jedoch lediglich einen kleinen Teil der gesamten Epithelzellpopulation dar (MORAN ET AL., 2008; STERNINI ET AL., 2008). Neben ihrem Vorkommen innerhalb des Kryptenepithels vorwiegend an der Basis der Zotten lokalisiert, liegen enteroendokrine Zellen dort entweder abgeflacht und von umliegenden Epithelzellen bedeckt oder als schlanke, Mikrovilli-tragende Zellen mit unmittelbarem Kontakt zum intestinalen Lumen (NEUTRA, 1988). Die von ihnen produzierten, gastrointestinalen Hormone und freigesetzten biogenen Amine können neuro- und endokrin bzw. direkt auf benachbarte Epithelzellen (sog. parakrine Sekretion) wirken, und sind u.a. an der Regulation der Drüsensekretion von Magen und Pankreas sowie an der Kontraktion der Gallenblasenmuskulatur beteiligt (LIDDLE ET AL., 1985; BECK, 1989; MAWE, 1991; HÖFER ET AL., 1999; CHEY UND CHANG, 2001; STERNINI ET AL., 2008).

Mit einem Anteil von etwa 0,1–0,4% an der Gesamtepithelzellzahl des Dünndarms stellen ebenso die Bürstenzellen eine äußerst selten vorkommende Population dar (GEBHARD UND GEBERT, 1999; GERBE ET AL., 2012). Im gesamten Dünndarmepithel verstreut, sind Bürstenzellen durch ihre ungewöhnliche Flaschenform sowie die bürstenartigen Ausstülpungen ihrer apikalen Zelloberfläche charakterisiert (TRIER UND MADARA, 1981; GEBHARD UND GEBERT, 1999; HÖFER ET AL., 1999). Mit ihren dicken, deutlich längeren Mikrovilli ragen diese spezialisierten, solitär vorkommenden Epithelzellen über den Bürstensaum benachbarter Enterozyten hinweg ins Lumen (NABEYAMA UND LEBLOND, 1974; TRIER ET AL., 1987) und scheinen, aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ihres apikalen Zellkompartiments zu Rezeptorzellen in Sinnesepithelien, ebenfalls zur Chemo-rezeption fähig (HÖFER ET AL., 1996; HÖFER UND DRENCKHAHN, 1998; BEZENCON ET AL., 2007). So sind Bürstenzellen vermutlich in der Lage, kleinmolekulare Nährstoffsubstanzen wahrzunehmen, die chemische Zusammensetzung des Feuchtigkeitsfilms auf der Schleimhautoberfläche zu prüfen und, über die Ausschüttung von Botenstoffen, möglicherweise die Muzin- und Bikarbonatproduktion des Epithels zu stimulieren (TRIER UND MADARA, 1981; HÖFER ET AL., 1996; HÖFER ET AL., 1999).

### 1.1.3.2 Epithelzellerneuerung

Zusätzlich zu den zellulären Schutzmechanismen gegenüber dem aggressiven Milieu des luminalen Darminhalts weist das intestinale Zottenepithel eine enorm hohe Zellerneuerungsrate auf (WATSON UND PRITCHARD, 2000). Im Bereich der, bis zur Muscularis mucosae reichenden Kryptenbasis generieren pluripotente Stammzellen mit relativ raschem Zellzyklus kontinuierlich neue epitheliale Vorläuferzellen, welche sich mehrfach teilen und innerhalb weniger Tage während ihres Aufstiegs aus dem tubulösen Kryptenlumen zu den verschiedenen Epithelzelltypen differenzieren (CHENG UND LEBLOND, 1974c; POTTEN ET AL., 1997; BJERKNES UND CHENG, 1999; GERBE ET AL., 2011; BJERKNES ET AL., 2012). Enteroendokrine Zellen verbleiben dabei vorwiegend innerhalb der Krypten bzw. in basalen Zottenregionen. Ausdifferenzierte, nicht mehr teilungsfähige Enterozyten und Becherzellen migrieren dagegen im Verband entlang der Basallamina in Richtung Zottenspitze, während sie zugleich ihre spezifischen Aufgaben wahrnehmen (GÜNTHER ET AL., 2013). In der Extrusionszone an der Spitze der Zotten angekommen, unterliegen die Zellen dem programmierten Zelltod, verlieren ihre Adhäsionsfähigkeit und werden schließlich ins Darmlumen abgeschilfert (GROSSMANN ET AL., 1998; CROSNIER ET AL., 2006; YUAN UND KROEMER, 2010). Auf diese Weise gehen beim Menschen täglich insgesamt  $10^{11}$  gealterte Epithelzellen ins Dünndarmlumen über – jeweils rund 1400 Zellen pro Zotte und Tag (POTTEN UND LOEFFLER, 1990). Ausgehend von den Krypten erneuert sich das Zottenepithel so kontinuierlich innerhalb von drei bis fünf Tagen (GÜNTHER ET AL., 2013; BARKER, 2014).

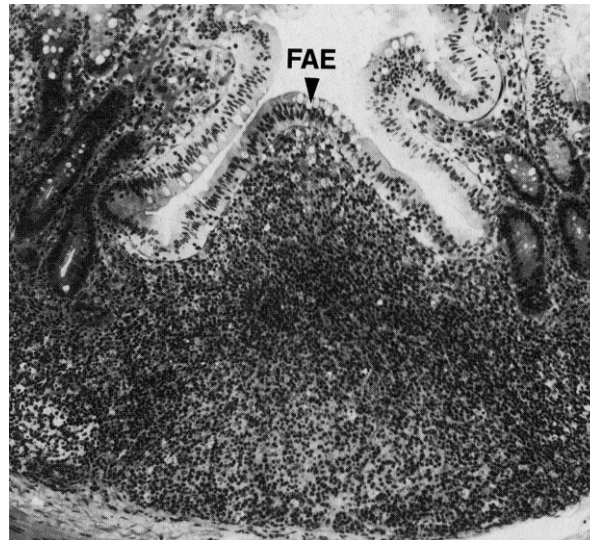
Auch die sekretorischen Paneth-Körnerzellen differenzieren sich aus pluripotenten Stammzellen innerhalb der Krypten, migrieren jedoch im Gegensatz zu den Vorläuferzellen des Zottenepithels nicht in Richtung Darmlumen, sondern werden nach einer Lebenszeit von zwei bis drei Wochen im basalen Drüsenepithel des Kryptengrunds ersetzt (CHENG UND LEBLOND, 1974c; TRIER UND MADARA, 1981). Durch die Sekretion antimikrobiell wirkender Peptide wie  $\alpha$ -Defensine und Lysozym ins Krypten- und Darmlumen verhindern Paneth-Zellen das Überleben sowie die Vermehrung von Mikroorganismen in unmittelbarer Nähe des Darmepithels (ERLANDSEN ET AL., 1974; BEVINS, 2006; BEVINS UND SALZMAN, 2011; CLEVERS UND BEVINS, 2013). Ein Fehlen dieser spezialisierten Drüsenzellen resultiert in einer Beeinträchtigung der intestinalen Barriere sowie in der vermehrten Besiedlung durch kommensale wie auch pathogene Mikroorganismen (VAISHNAVA ET AL., 2008).

## 1.2 Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe

Das Dünndarmepithel fungiert als zelluläre Grenzschicht für die, mit der Nahrung aufgenommenen Toxine, Antigene und Mikroorganismen und verhindert durch unspezifische Schutzmechanismen deren Eintritt ins darunter liegende Schleimhautbindegewebe. Die Aufrechterhaltung einer selektiven Permeabilität gegenüber Bestandteilen des Darminhalts sowie der gleichzeitige Schutz vor dem unkontrollierten Eindringen potenziell schädlicher Fremdstoffe und Mikrobiota in den Körper wird darüber hinaus durch ein Schleimhautspezifisches immunologisches Abwehrsystem gewährleistet. In seiner Gesamtheit als Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT) bezeichnet, besteht das intestinale Immunsystem aus aggregierten Lymphfollikeln, kleineren isolierten Solitärfollikeln sowie aus zahlreichen, diffus verteilten Lymphozyten (BIENENSTOCK ET AL., 1978). Es umfasst mit mehr als 60% der gesamten T-Zellpopulation den Großteil der körpereigenen zellulären Immunabwehr (GUY-GRAND UND VASSALLI, 1993). Über den gesamten Dünndarm hinweg verstreut, ermöglicht das GALT eine zellvermittelte immunologische Überwachung des luminalen Darminhalts sowie eine permanente Unterscheidung zwischen harmlosen Nahrungsproteinen, kommensalen Darmbakterien und invasiven Pathogenen (MOWAT, 2003). Die lymphatischen Sekundärfollikel dienen dabei vor allem der kontrollierten Aufnahme und Präsentation luminaler Antigene sowie der Einleitung spezifischer Immunantworten.

### 1.2.1 Peyer-Plaques

Während bereits einzelne lymphatische Solitärfollikel in der Tela submucosa proximaler Dünndarmabschnitte liegen, finden sich die Peyer-Plaques (Noduli lymphoidei aggregati) als Ansammlungen aggregierten lymphatischen Gewebes vor allem in der Wand des distalen Jejunums und Ileums (CORNES, 1965; VAN KRUININGEN ET AL., 2002). Dem Ansatz des Mesenteriums gegenüberliegend, imponieren die organisierten Lymphfollikel als makroskopisch sichtbare, rundlich bis ovale Vorwölbungen der Lamina propria mucosae sowie der Tela submucosa. Jeder Plaque besteht aus lymphoretikulärem Gewebe mit mehreren B-Zell-Follikeln sowie kleineren interfollikulären T-Zell-Regionen (BRANDTZAEG ET AL., 1999; NEUTRA ET AL., 2001). Die subepithelialen Ansammlungen von B- und T-Lymphozyten, Makrophagen sowie dendritischen Zellen (DC) ragen dabei, teils von umliegenden Zotten bedeckt, als sog. Dom-Areale gewölbeartig ins Lumen (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3** Zur Einleitung spezifischer Immunantworten finden sich die Peyer-Plaques als organisierte Ansammlungen sekundärer Lymphfollikel hauptsächlich in der Lamina propria mucosae und Tela submucosa des distalen Jejunums und Ileums (nach NEUTRA, 1988). Morphologisch kann zwischen B-Zell-Follikeln, kleineren interfollikulären T-Zell-Regionen sowie dem Follikel-assoziierten Epithel (FAE) unterschieden werden. M-Zellen als spezialisierte Epithelzellen mit charakteristischen Mikrofalten auf ihrer apikalen Oberfläche stellen den Eintrittsweg für Antigene aus dem Lumen in das darunter liegende, lymphatische Gewebe dar. An Stellen, an denen die Schleimhaut gewölbeartig ins Lumen ragt, fehlen die sonst charakteristischen Zotten und Krypten.

Dem organisierten lymphatischen Gewebe der Peyer-Plaques liegt eine Schicht aus spezialisiertem, Follikel-assoziiertem Epithel (FAE) auf, welches sich histologisch deutlich vom umliegenden Oberflächenepithel der Zotten unterscheidet (OWEN UND JONES, 1974). So enthält das immunkompetente FAE zahlreiche, hochspezialisierte M-Zellen (*microfold cells*), deren luminale Oberfläche beim Menschen ein charakteristisches Netzwerk von flachen Mikrofalten aufweist (GEBERT ET AL., 1996; OWEN, 1999; GEBERT ET AL., 2004). Durch das Fehlen einer dicken Glykokalyx sowie des typischen Bürstensaums für luminale Antigene und Bakterien leicht zugänglich (BYE ET AL., 1984; FREY ET AL., 1996), nehmen M-Zellen über ihre apikale Membran Proben aus dem Darmlumen auf und leiten diese an die nachgeschalteten Immunzellen innerhalb der M-Zelltaschen weiter (WOLF UND BYE, 1984; NEUTRA ET AL., 1996a; NEUTRA ET AL., 1996b; GEBERT, 1997; NEUTRA ET AL., 2001; GEBERT ET AL., 2004). Über M-Zell-spezifische, transzelluläre Poren können DC darüber hinaus auch direkt Moleküle und Partikel aus dem Lumen aufnehmen und an naive Lymphozyten der Peyer-Plaques weiterleiten (LELOUARD ET AL., 2012). Somit ermöglichen M-Zellen einen transepithelialen Durchtritt der internalisierten Antigene ins lym-

phatische Gewebe sowie einen unmittelbaren Kontakt spezialisierter Lymphozyten und Antigen-präsentierender Zellen (APC) mit dem Darmlumen (NEUTRA ET AL., 1996b; REGOLI ET AL., 1995). Bei der Erkennung potenzieller Pathogene werden spezifische Immunantworten initiiert, nicht-pathogene omnipräsente Antigene und kommensale Mikroorganismen dagegen immunologisch toleriert (MOWAT UND VINEY, 1997; BRANDTZAEG ET AL., 1999; MOWAT, 2003).

### 1.2.2 Diffus verteilte Lymphozyten

Zusätzlich zum organisierten lymphatischen Gewebe der Lymphfollikel umfasst das Darm-assoziierte Abwehrsystem zahlreiche, diffus verteilte Lymphozyten, die als Teil der adaptiven Immunantwort sowohl im lockeren Bindegewebe der Lamina propria mucosae wie auch im Oberflächenepithel der gesamten Darmschleimhaut vorkommen (MOWAT UND VINEY, 1997). Neben APC, wie Makrophagen und DC, finden sich so im Schleimhautbindegewebe hauptsächlich Antikörper-sezernierende Plasmazellen sowie  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Effektorzellen (ZEITZ ET AL., 1991; MACDONALD UND PENDER, 1998; RESÉNDIZ-ALBOR ET AL., 2005). Obwohl nur durch eine dünne Basalmembran voneinander getrennt, unterscheidet sich die Lymphozytenpopulation innerhalb des Dünndarmepithels aufgrund ihrer funktionellen sowie phänotypischen Besonderheiten erheblich von der des Schleimhautbindegewebes (MOSLEY ET AL., 1990; LEFRANCOIS, 1991; MALOY ET AL., 1991).

### 1.2.3 Intraepitheliale Lymphozyten

Zwischen den Epithelzellen im intestinalen Zellverband lokalisiert, stellen intraepitheliale Lymphozyten (IEL) eine der ersten Verteidigungslinien der mukosalen Immunabwehr zwischen dem Darmlumen sowie dem Körperinneren dar und besitzen, bedingt durch ihre exponierte Lage, eine essentielle Bedeutung in der Sicherung und Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität. Im Gegensatz zu Lymphozyten der Lamina propria mucosae sowie peripheren Populationen umfassen über 90% der intraepithelialen Lymphozyten  $CD3^+$  T-Zellen, wovon wiederum etwa 80% das Oberflächenprotein CD8 tragen (GUY-GRAND UND VASSALLI, 1993; LEFRANCOIS, 1994). Der überwiegende Anteil der IEL besitzt einen Antigen-erfahrenen Phänotyp, welcher sich auch ohne vorherrschende Infektion durch die Expression verschiedener Aktivierungsmarker auf ihrer Zelloberfläche charakterisiert (CHEROUTRE, 2004). Abhängig vom Mechanismus ihrer Aktivierung können die extrem

heterogenen intraepithelialen Lymphozyten in zwei Subpopulationen untergliedert werden (GUY-GRAND ET AL., 1991; CHEROUTRE ET AL., 2011). Die unkonventionellen, natürlichen IEL erwerben ihren aktivierten Phänotyp bereits während ihrer Reifung im Thymus und migrieren daraufhin, ohne negative Selektion durch körpereigene Antigene, als CD4<sup>-</sup>CD8αβ<sup>-</sup> Vorläuferzellen direkt ins intestinale Epithel (LEISHMAN ET AL., 2002; GANGADHARAN ET AL., 2006; JENSEN ET AL., 2008). Anstelle des membranständigen α:β-Heterodimers exprimieren diese Antigen-unspezifisch autoreaktiven IEL das unkonventionelle homodimere CD8αα sowie entweder einen α:β- oder γ:δ-T-Zell-Rezeptor (GUY-GRAND ET AL., 1991; LEFRANCOIS, 1991). Dagegen werden die induzierten IEL als Nachkommen konventioneller, naiver CD4<sup>+</sup> oder CD8αβ<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> T-Zellen im Anschluss an die Differenzierung im Thymus durch periphere Antigene innerhalb des lymphatischen Gewebes der Peyer-Plaques, der mesenterialen Lymphknoten oder anderer, sekundär lymphatischer Organe aktiviert (LEFRANCOIS UND MASOPUST, 2002; SINGER ET AL., 2008; CARPENTER UND BOSSELUT, 2010).

Die Einwanderung ins, und spezifische Lokalisation der intraepithelialen Lymphozyten im Epithel wird durch das Integrin α<sub>E</sub>β<sub>7</sub> vermittelt, welches sich aus einer CD103- und einer β<sub>7</sub> Integrin-Untereinheit zusammensetzt und mit E-Cadherin an der basolateralen Membran der Epithelzellen interagiert (KILSHAW UND MURANT, 1990; CEPEK ET AL., 1994; STATON ET AL., 2006; AGACE, 2008). Bedingt durch ihren direkten Kontakt mit Epithelzellen der Dünndarmschleimhaut sowie der unmittelbaren Nähe zum Darmlumen dienen IEL der immunologischen Überwachung und Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere und besitzen zugleich immunoprotektive wie auch -regulatorische Aufgaben. Im Rahmen der adaptiven Immunantwort erfüllen aktivierte intraepitheliale Lymphozyten schützende Effektorfunktionen gegenüber luminalen, invasiven Pathogenen, und verhindern dadurch deren initialen Eintritt und die Ausbreitung im Gewebe (CHEROUTRE ET AL., 2011). Zudem erkennen die zytotoxisch aktiven Effektorzellen zelluläre Schädigungen sowie spezifische, von infizierten Epithelzellen präsentierte Peptide oder intrazelluläre Krankheitserreger, sezernieren daraufhin Effektorzytokine wie IFNγ, Perforin und Granzym, und beseitigen so degenerierte oder virusinfizierte Zellen (GOODMAN UND LEFRANCOIS, 1989; GUY-GRAND ET AL., 1996; MÜLLER ET AL., 2000; SHIRES ET AL., 2001; OGATA ET AL., 2013). Neben ihrer spontan zytotoxischen Aktivität zeigen die intraepithelialen Lymphozyten ferner eine Reihe von regulatorischen Eigenschaften, wodurch eine überschießende, die funktionelle Integrität gefährdende Entzündungsreaktion verhin-

dert, die Epithelzellerneuerung sowie -reparatur gefördert und das Epithel so vor lokalen Gewebeschäden infolge exzessiver Immunantworten geschützt wird (KOMANO ET AL., 1995; GUY-GRAND ET AL., 1998; CHEN ET AL., 2002; POUSSIER ET AL., 2002; INAGAKI-OHARA ET AL., 2006; DENNING ET AL., 2007; ISMAIL ET AL., 2009). Durch ihren regulierenden Einfluss innerhalb verschiedener Abwehrmechanismen sind die IEL ebenso an der Vermeidung von Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Bestandteilen aus der Nahrung sowie kommensalen Mikroorganismen beteiligt (MENGEL ET AL., 1995; FUJIIHASHI ET AL., 1999; CHEROUTRE ET AL., 2011).

Trotz zahlreicher Untersuchungen zur funktionellen sowie phänotypischen Ausprägung dieser Lymphozytenpopulation ist bislang nur wenig darüber bekannt, wie die IEL das Epithel im Hinblick auf geschädigte, entartete oder infizierte Epithelzellen überprüfen und so ihre immunologische Rolle als Wächter des Epithels wahrnehmen. Dem grundlegenden Verständnis der intravitalen Immunvorgänge sowie der zugrunde liegenden physiologischen Überwachungsmechanismen innerhalb des intakten Dünndarmepithels kommt daher eine immer größer werdende Bedeutung zu.

## 2 Zielstellung

Die Dünndarmschleimhaut besitzt eine enorm große Oberfläche und ist, bedingt durch ihren unmittelbaren Kontakt zur Außenwelt, auf die Erfüllung verschiedenster funktionseller Anforderungen ausgelegt. Da die quantitativen Daten ihrer Resorptionsfläche in der Literatur stark differieren, unvollständig und z.T. gegensätzlich sind, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst die innere Oberfläche der Dünndarmschleimhaut der Maus morphometrisch erfasst und deren Gesamtvergrößerung verlässlich kalkuliert werden. Unter Verwendung licht- und elektronenmikroskopischer Referenztechniken sollte die Oberflächenvergrößerung durch Zotten und Mikrovilli innerhalb verschiedener Dünndarmabschnitte *ex vivo* quantifiziert und dadurch sowohl die Resorptions- wie auch Angriffsfläche für eine Vielzahl von luminalen Noxen und invasiven Erregern bestimmt werden.

Trotz der enormen Oberfläche und ständigen Exposition gegenüber potenziell schädlichen Umweltfaktoren bleibt die epitheliale Integrität der Schleimhaut im Normalfall dauerhaft erhalten. Obwohl intraepitheliale Lymphozyten der Sicherstellung der Homöostase und Barrierefunktion des Epithels dienen, sind die Mechanismen ihrer immunologischen Überwachung sowie intravitalen Interaktionen mit den residenten Epithelzellen bislang weitgehend ungeklärt. Zum besseren Verständnis der zellulären Kinetik sollte im Hauptteil dieser Arbeit die Dynamik einzelner IEL innerhalb des intestinalen Zottenepithels *in vivo* quantifiziert und deren Interaktionen mit dem umliegenden Gewebe unter physiologischen Bedingungen untersucht werden. Mit der Etablierung der intravitalen Zwei-Photonen-Mikroskopie sollte hierzu die komplexe Morphologie der intakten Dünndarmschleimhaut einer lebenden Maus hochaufgelöst dargestellt, Zelltypen anhand ihrer autofluoreszierenden Eigenschaften identifiziert und das Migrationsverhalten der IEL im Epithelverband analysiert werden. Neben der Beurteilung ihres Bewegungsmusters sollten Parameter wie Geschwindigkeiten, Kontaktzeiten mit umliegenden Epithelzellen sowie Einflussfaktoren auf die Dynamik der IEL ermittelt und letztlich das numerische Verhältnis der Epithelzellen zu IEL auf den gesamten Dünndarm extrapoliert werden. Durch die so gewonnenen Erkenntnisse zur Dynamik der epithelialen Immunabwehr könnten neue Einblicke in die immunologischen Überwachungsvorgänge der intakten Dünndarmschleimhaut erlangt und Grundlagen für das therapeutische Verständnis einer Vielzahl von entzündlichen Darmerkrankungen geschaffen werden.



### 3 Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fragestellungen methodisch unabhängig voneinander untersucht. Während die Quantifizierung der inneren Oberfläche des murinen Dünndarms auf *ex vivo* Versuchen basierte, lag der mikroskopischen Untersuchung dynamischer Prozesse innerhalb der lebenden Dünndarmschleimhaut ein *in vivo* Mausmodell zugrunde. Aufgrund der verschiedenen Ansätze ist der Methodenteil entsprechend untergliedert. Zunächst sind die experimentelle Durchführung und Analysen der licht- und elektronenmikroskopischen Referenztechniken beschrieben. Im Anschluss werden die physikalisch-technischen Grundlagen der Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie vorgestellt und der Versuchsaufbau sowie das Vorgehen erläutert.

#### 3.1 Versuchstiere

Für die morphometrischen Untersuchungen der murinen Dünndarmschleimhaut wurden 8–12 Wochen alte und 28–30 g schwere, ausnahmslos weibliche Mäuse vom Stamm NMRI (Naval Medical Research Institute) verwendet. Die Tiere wurden von Charles River Laboratories (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland) bezogen und im Institut für Versuchstierkunde und Tierschutz (IVTK, Uniklinikum Jena, Deutschland) unter SPF-Bedingungen mit freiem Zugang zu Standard-Pelletfutter und Wasser *ad libitum* gehalten.

Der Untersuchung dynamischer Prozesse innerhalb der Schleimhaut des Dünndarms lagen *ex vivo* sowie *in vivo* Versuche an Balb/c Mäusen zugrunde. Die weiblichen, bei Versuchsbeginn zwischen 8–14 Wochen alten und 16–23 g schweren Versuchstiere wurden von Janvier Labs (Saint-Berthevin, Frankreich) bezogen und ebenfalls konform der Richtlinien des aktuellen Tierschutzgesetzes unter Standardbedingungen mit freiem Zugang zu pelletiertem Trockenfutter und Wasser *ad libitum* gehalten. In spezifiziert pathogenfreien Tierhaltungsräumen (Service Einheit Kleinnager, Universitätsklinikum Jena, Deutschland) wurden, unter Berücksichtigung einer klimatisierten Umgebung sowie der Einhaltung eines 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus, maximal 5 Balb/c Mäuse in einem Käfig gehalten und von geprüften Versuchstierpflegern betreut.

## 3.2 Licht- und elektronenmikroskopische Referenztechniken

### 3.2.1 Organentnahme

Die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen des murinen Dünndarms fanden *ex vivo* statt. Nach Tötung der Mäuse durch Inhalation einer Überdosis CO<sub>2</sub> bzw. zervikale Dislokation wurde die muskuläre Bauchwand durch einen medianen Hautschnitt freigelegt, die Peritonealhöhle ventral entlang der Linea alba eröffnet und der Dünndarm anschließend in seiner gesamten Länge vom Pylorus bis zum Caecum herauspräpariert. Für die Quantifizierung der inneren Oberfläche wurde der explantierte Darm vom mesenterialen Fett- und Bindegewebe befreit, unter leichtem Druck mit 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4, 4 °C) gespült und anschließend mit einem Gemisch aus 4% Paraformaldehyd und 0,5% Glutardialdehyd (EM Grade, Polyscience, USA) (in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,4, 5% Sucrose, 4 °C) luminal fixiert. Durch zügiges Vorgehen lag der komplett herauspräparierte Dünndarm spätestens 10–15 min nach erfolgter Tiertötung fixiert vor. Im Anschluss an eine Gesamtlängenmessung erfolgte die longitudinale Eröffnung des Darmlumens entlang der mesenterialen Aufhängung sowie die Immersionsfixation des, mit der äußeren Darmwand auf einer Paraffin-beschichteten Unterlage aufgespannten, komplett eröffneten Dünndarms über mindestens 24 h bei 4 °C. Insgesamt wurden auf diese Weise 6 NMRI Mäuse zur Quantifizierung der inneren Oberfläche ausgewählt. Für die Untersuchung der Lokalisation intraepithelialer Lymphozyten im Zottenepithel wurden frisch entnommene Segmente des Dünndarms von zwei Balb/c Mäusen nach Entfernung überschüssiger Bindegewebsreste und Fettanhängsel am Mesenterialansatz durchtrennt, in Gewebestücken von 2 mm x 1 mm geschnitten und im Anschluss an das Spülen mit Ringerlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) bei 4 °C über Nacht fixiert. Die Fixierlösung setzte sich aus 1% Glutaraldehyd (EM Grade, Polyscience, USA) und 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) zusammen, und wurde in diesem Zeitraum 3x gewechselt. Die durchgeführten Organentnahmen wurden im Rahmen einer Anzeige zur Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken genehmigt.

### 3.2.2 Herstellung von Dünnschnittpräparaten

Die verschiedenen Abschnitte des Dünndarms sind lediglich anhand einer histologischen Differenzierung der Schleimhaut sowie Tela submucosa zu unterscheiden. Makroskopisch lassen sich Duodenum, Jejunum und Ileum nicht klar voneinander abgrenzen. Aufgrund der, jedoch bereits in der Literatur beschriebenen, abschnittsspezifischen Unterschiede

innerhalb der Morphometrie der luminalen Schleimhautoberfläche wurde der als Ganzes explantierte und longitudinal eröffnete Dünndarm in vier verschiedene Abschnitte unterteilt. In Abhängigkeit der jeweiligen Gesamtlänge des Dünndarms wurden, vom Pylorus beginnend, nach 10%, 30%, 60% sowie nach 90% vergleichbar große Gewebeproben entnommen. Der am weitesten oral gelegene Dünndarmabschnitt wurde im Folgenden als duodeno-jejunaler Übergang definiert, die sich anschließenden Darmabschnitte jeweils absteigend dem Jejunum, jejuno-ilealen Übergang sowie dem terminalen Ileum zugeordnet. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Proben keine Peyer-Plaques enthielten. Aus den entnommenen Proben wurden daraufhin Präparate angefertigt, die für eine lichtmikroskopische Betrachtung geeignet waren. Einzelne, immersionsfixierte Gewebeproben wurden ohne vorherige Entwässerung und Einbettung mithilfe einer frischen Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten und je nach Fragestellung in Längsrichtung bzw. Queransicht der Zotten auf einem Objektträger ausgerichtet. Anhand sehr schmaler, quer zur Längsachse des Darms verlaufender Gewebstreifen konnten die Zotten der Länge nach vermessen werden. Annähernd rechteckige, mit der luminalen Oberfläche nach unten orientierte Darmstücke dienten der Bestimmung verschiedener stereologischer Parameter basaler Zottenquerschnitte sowie deren Flächendichte.

### 3.2.3 Herstellung von Ultradünnschnitten

Für die Herstellung von Ultradünnschnitten wurden entnommene Darmstücke zunächst mit 0,1 M Cacodylatpuffer (4x 5–10 min, bei RT) gespült und anschließend 2 h bei 4 °C in einer frisch zubereiteten Lösung (1:1) aus 2% OsO<sub>4</sub> (Science Services, Deutschland) (in Aqua tridest.) und 3% Kaliumferrocyanid (in 0,2 M Cacodylatpuffer, pH 7,4) nachfixiert. Nach mehrmaligem Spülen mit 0,1 M Cacodylatpuffer (4x 5–10 min, bei RT) wurde den Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe Wasser entzogen. Anschließend wurden die Gewebeproben über Acetonitril in EPON 812 (FERAK Berlin, Deutschland) eingebettet und 1 h bei RT, nachfolgend über eine Dauer von 6 d bei 60 °C ausgehärtet. Von den Kunststoffblöcken wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Die mithilfe eines Ultramikrotoms Reichert Ultracut S (Leica AG, Wien, Österreich) sowie unter Verwendung von *low angle* Diamantmessern (Diatome, Biel, Schweiz) angefertigten Schnitte hatten eine Schnittdicke von 30–40 nm. Die Ultradünnschnitte wurden auf Formvar-beschichtete Kupfernetze aufgebracht und mit 1% Uranylacetat für 10 min kontrastiert. Die Komplettierung der Kontrastierung erfolgte mit einer frisch zubereiteten Lösung aus Bleicitrat

(zusammengesetzt aus 25 mg Bleicitrat in 10 µl siedendem Aqua tridest. und einem Zusatz von 100 µl einer 10 M NaOH Stammlösung). Die Dauer dieses Kontrastierungsschrittes betrug 20–30 sec bei RT. Die kontrastierten Ultradünnschnitte wurden in einem Transmissionselektronenmikroskop EM 902A (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) des Elektronenmikroskopischen Zentrums (Universitätsklinikum Jena) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV untersucht und dienten der elektronenmikroskopischen Beurteilung der Morphometrie einzelner Mikrovilli sowie der Lokalisation intraepithelialer Lymphozyten im Dünndarmepithel.

### 3.2.4 Quantitative Auswertung

Während die Beurteilung der Lokalisation intraepithelialer Lymphozyten im Dünndarmepithel deskriptiv erfolgte, wurde die Vergrößerung der inneren Oberfläche des murinen Dünndarms, auf erhobenen, morphometrischen Parametern basierend, quantitativ ermittelt.

#### 3.2.4.1 Bestimmung der Darmfläche

Die Bestimmung der planen Dünndarmfläche erfolgte makroskopisch unmittelbar im Anschluss an die longitudinale Eröffnung des Darmlumens. Der Flächeninhalt wurde aus der Summe der jeweiligen Integrale von Länge und Breite der einzelnen, vorher festgelegten Dünndarmabschnitte berechnet (Abbildung 3.1) und diente für jeden untersuchten Dünndarm als Ausgangswert der Oberflächenvergrößerung.

$$A_{\frac{1}{2}n} = \frac{1}{2} \left( \frac{d_n - d_{n-1}}{x_n - x_{n-1}} \right) * (x_n - x_{n-1})^2 + (d_{n-1} * (x_n - x_{n-1}))$$

**Abbildung 3.1** Berechnung des Flächeninhalts der halben, planen Darmfläche  $A_{\frac{1}{2}n}$  aus der Summe der Integrale einzelner Dünndarmabschnitte, wobei  $x_n$  der Länge eines jeweiligen Abschnitts am aboralen Ende,  $x_{n-1}$  der des oralen Anfangs entspricht,  $d_n$  und  $d_{n-1}$  die entsprechenden, halbierten Darmbreiten der jeweiligen Abschnitte darstellen.  $n$  bezeichnet den jeweiligen Dünndarmabschnitt.

#### 3.2.4.2 Oberflächenvergrößerung durch Zotten

Die Generierung lichtmikroskopischer Durchlichtaufnahmen erfolgte mithilfe eines Axio-Imager-Mikroskops (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) sowie einer monochromen CCD-Kamera (Zeiss-Axio-Cam MRc) bei 10-, 20- sowie 40-facher Vergrößerung. Für die Bildaufnahme und -speicherung wurde die Software Axio Vision Rel. 4.6 (Carl Zeiss

MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Die Bildanalyse erfolgte mithilfe des Java-basierten Bildbearbeitungsprogramms ImageJ. In Abhängigkeit der jeweiligen Vergrößerung wurden die Pixelgröße programmintern definiert und so sämtliche Werte in  $\mu\text{m}$  ausgegeben. Neben dem Zottenumfang, dem Maximal- ( $d_{\text{max}}$ ) und Querdurchmesser ( $d_{90^\circ}$ ) sowie der Zottenhöhe ging zusätzlich deren Anzahl pro definiertem Bildfeld ( $900 \mu\text{m} \times 674,35 \mu\text{m}$ ) in die quantitative Auswertung ein. Der basale Zottenquerschnitt wurde als *region of interest (ROI)* kurz oberhalb der Kryptenmündungen manuell markiert und daraus Umfang,  $d_{\text{max}}$  und  $d_{90^\circ}$  sowie die Fläche einzelner Zotten im Bildfeld bestimmt. Die Zottenhöhe wurde als Abstand zwischen der Ebene benachbarter Kryptenmündungen und der Zottenspitze definiert. Weiterführende Berechnungen der Zottenoberfläche sowie Schleimhautvergrößerung erfolgten schließlich in Microsoft Excel (Version 2010, Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA). Anhand eines vereinheitlichten, geometrischen Modells mit elliptischem Zylinder und einem halbierten, triaxialen Ellipsoid als Zottenspitze wurde die abschnittsspezifische Oberfläche einzelner Zotten rechnerisch aus deren Höhe, Umfang, Maximal- sowie Querdurchmesser bestimmt. Die integralfreie Annäherung der Oberfläche eines triaxialen Ellipsoids erfolgte dabei mithilfe der Näherungsformel nach Thomsen (XU ET AL., 2009). Die Vergrößerung der Dünndarmschleimhaut ergab sich aus dem Produkt der gemittelten Zottenoberfläche und jeweils, auf den gesamten Dünndarm extrapolierten Zottenanzahl, addiert mit der Zotten-freien Fläche zwischen den Zottenbasen. Für die Berechnung der Fläche des Zwischenzottenraums wurde die Anzahl der Zotten pro Dünndarm mit der mittleren Querschnittsfläche multipliziert und das Produkt von der planen Darmfläche abgezogen. Die Krypten wurden dabei nicht in die Oberflächenvergrößerung der Schleimhaut einbezogen.

#### 3.2.4.3 Oberflächenvergrößerung durch Mikrovilli

Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop analysiert, wobei für die Aufnahmen eine Primärvergrößerung zwischen 3300x und 64000x gewählt wurde. Die Bildanalyse erfolgte analog zur stereologischen Untersuchung der Zotten mithilfe des Java-basierten Bildbearbeitungsprogramms ImageJ. Während die Höhe einzelner Mikrovilli in histologischen Längsschnitten als Distanz zwischen deren Spitze und dem Ansatz am Enterozyt bestimmt wurde, ging deren Durchmesser und Anzahl pro definiertem Bildfeld ( $0,505 \mu\text{m} \times 0,505 \mu\text{m}$ ) aus ultrastrukturellen Querschnitten hervor. Sämtliche Parameter wurden jeweils der Zottenbasis sowie -spitze zugeordnet. Die

Berechnungen der Gesamtvergrößerung der Resorptionsfläche wurden nachfolgend anhand des arithmetischen Mittels der Werte ebenfalls in Microsoft Excel (Version 2010, Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA) durchgeführt. Dazu wurde ein geometrisches Modell mit gleichförmigem Zylinder und Halbkugel als Mikrovillusspitze herangezogen. Die Gesamtvergrößerung der inneren Oberfläche des Dünndarms wurde, analog zur Oberflächenvergrößerung durch Zotten, aus dem Produkt der mittleren Oberfläche der Mikrovilli sowie der Gesamtanzahl, addiert mit der Mikrovilli-freien Fläche der apikalen Epithelzellmembran ermittelt. Für die Berechnung der Fläche zwischen den Mikrovilli wurde deren Gesamtzahl pro Dünndarm mit der mittleren Querschnittsfläche multipliziert und das Produkt von der zuvor bestimmten Dünndarmfläche mit Zotten abgezogen. Becherzellen wurden nicht in die Berechnungen einbezogen. Die epitheliale Zelldichte wurde *in vivo* quantifiziert.

### **3.3 Intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie**

Mit der Entwicklung und Etablierung der Intravitalmikroskopie wurde es möglich, lebende Prozesse innerhalb verschiedener Gewebe auf zellulärer Ebene zu untersuchen und besser zu verstehen. Um neue Einblicke in die Dynamik der intraepithelialen Lymphozyten zu erlangen, wurde die intakte Dünndarmschleimhaut der Maus mithilfe der hochauflösenden Zwei-Photonen-Mikroskopie über mehrere Minuten bis Stunden hinweg bildgebend untersucht. Die Zwei-Photonen-Mikroskopie nutzt dabei eine nicht-lineare Absorption des Anregungslichtes, um Fluoreszenz zu erzeugen. Da der methodische Ansatz der, dieser Arbeit zugrunde liegenden *in vivo* Versuche neben den biologischen Ergebnissen von besonderer Bedeutung ist, werden in diesem Kapitel zunächst die physikalisch-technischen Grundlagen der Zwei-Photonen-Mikroskopie vorgestellt und die darauf basierende, Laser-induzierte Anregung autofluoreszierender Strukturen näher erläutert. Der experimentelle Versuchsaufbau der Zwei-Photonen-Mikroskopie, das *in vivo* Mausmodell sowie Verfahren zur Akquirierung und Auswertung der Bilddaten sind nachfolgend beschrieben.

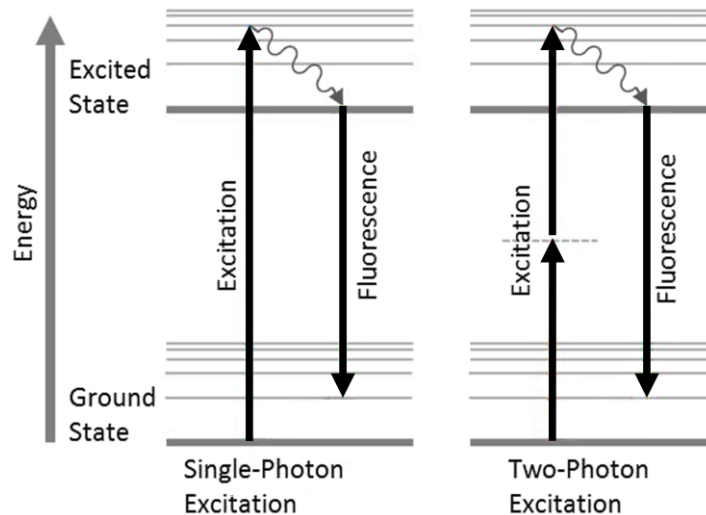
#### **3.3.1 Grundlagen der Zwei-Photonen-Mikroskopie**

Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie stößt bei der Untersuchung von Zellen im Inneren eines Gewebes an ihre Grenzen, da die vielfache Streuung der durch das homogene Anregungslicht erzeugten Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene sowohl das Auflösungsvermögen als auch den Kontrast erheblich verringert. Eine Reduktion des *out of focus*

Lichtes kann auf unterschiedliche Weise erreicht werden. Durch die Abbildung einer punktförmigen Lichtquelle in das Präparat sowie der Verwendung einer Lochblende im abbildenden Strahlengang wird in der Konfokalmikroskopie die Aufzeichnung von Streulicht aus umliegenden Gewebeschichten minimiert, der Tiefenschärfebereich reduziert und so ein optischer Schnitt erzeugt. Im Gegensatz zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie gelangt dadurch nur Licht aus einem kleinen Volumen ober- und unterhalb der Schärfenebene zum Detektor. Zwar wird durch die Erzeugung einer schwachen Beleuchtungsintensität um den Fokuspunkt sowie der Blockierung der Hintergrundsignale ebenfalls fluoreszierender Moleküle aus höher und tiefer liegenden Schichten eine bessere Auflösung entlang der optischen Achse erreicht, dabei nimmt jedoch auch die Anzahl der, vom Objektiv eingefangenen Photonen und somit die Bildhelligkeit stark ab. Um in der Konfokalmikroskopie dennoch ausreichend hohe Fluoreszenzsignale detektieren zu können, wird das Gewebe innerhalb des erzeugten Lichtkegels von kurzwelligem Anregungslicht bestrahlt und ist daher ebenso auch außerhalb des Fokus hohen Lichtintensitäten ausgesetzt.

Ähnlich der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie werden auch bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie Moleküle durch Bestrahlung mit Licht in einen angeregten Zustand überführt. Allerdings ermöglicht diese spezielle Form der Fluoreszenzmikroskopie eine, ausschließlich innerhalb der Fokusebene stattfindende Anregung von Chromophoren mit infrarotem, langwelligem Licht, wodurch die phototoxische Schädigung des Gewebes auf den Fokus beschränkt und die Entstehung von Streulicht verhindert wird (ZIPFEL ET AL., 2003b). Dadurch können lebende Zellen im Zusammenhang mit dem umliegenden Gewebe unter physiologischen Bedingungen visualisiert und somit intakte Organe und Interaktionen von Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg beobachtet werden (HELMCHEN UND DENK, 2002; MILLER ET AL., 2002; MASTERS UND SO, 2008; STEVEN ET AL., 2008; KLINGER ET AL., 2012). Das physikalische Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie beruht auf einem Effekt, der bereits 1931 durch Maria Göppert-Mayer theoretisch vorhergesagt, jedoch erst in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts durch die Entwicklung geeigneter Laser experimentell umgesetzt wurde (GÖPPERT-MAYER, 1931; DENK ET AL., 1990). Dabei wird ein Farbstoffmolekül durch Absorption zweier Photonen mit jeweils halber Energie in denselben energetisch angeregten Zustand versetzt wie durch Absorption eines einzelnen, energiereichen Photons (OHEIM ET AL., 2006; ZINSELMAYER ET AL., 2009). Im Gegensatz zu linearen Absorptionsprozessen ist das emittierte Licht dabei kurzwelliger als das zuvor anregende (CAHALAN ET AL., 2002). Die Gegenüberstellung der Jablonski-

Diagramme in Abbildung 3.2 veranschaulicht, dass die beim Übergang in den Grundzustand freiwerdende, elektromagnetische Strahlung sowohl von einem einzelnen Photon als auch von zwei Photonen mit doppelter Wellenlänge stammen kann.



**Abbildung 3.2** Vereinfachtes Jablonski-Diagramm der Ein- und Zwei-Photonen-Anregung. Ein Fluoreszenz-molekül kann von einem Grundzustand  $S_0$  in einen angeregten  $S_1$ - oder  $S_2$ - Zustand überführt werden. Beim Übergang in den energetisch niedrigeren Ausgangszustand wird Energie in Form von Licht freigesetzt, wobei die spontane Emission dabei unabhängig von Art der Anregung erfolgt. So kann ein Elektron innerhalb eines Fluorophors durch Absorption eines energiereichen, kurzwelligen Photons auf ein höheres Energieniveau gehoben, die notwendige Anregungsenergie aber auch auf zwei energieärmere, längerwellige Photonen aufgeteilt werden. Das nachfolgend spontan emittierte Licht besitzt bei beiden physikalischen Anregungsprozessen die gleiche Wellenlänge. Die gewellten Pfeile zeigen die Energie, die ohne Fluoreszenz verloren geht ( $E_f \leq 2E_{ex}$ ).

Da die beiden Anregungsphotonen in ihrer Summe die gleiche Energie besitzen wie sonst ein einzelnes Photon, kann zur Generierung von Fluoreszenzsignalen langwelliges Licht aus dem Infrarot-Bereich verwendet werden. Die geringere Streuung des energieärmeren Lichtes an verschiedenen Gewebsstrukturen ermöglicht höhere Eindringtiefen und damit, im Vergleich zur Ein-Photonen-Mikroskopie, eine kontrastreiche Bildgebung selbst tiefer liegender Gewebeschichten (OHEIM ET AL., 2001; ZIPFEL ET AL., 2003b; HELMCHEN UND DENK, 2005). Voraussetzung für die Zwei-Photonen-Anregung ist eine annähernd gleichzeitige, innerhalb von etwa  $10^{-18}$  sec stattfindende Absorption beider Lichtteilchen (ZINSELMAYER ET AL., 2009). Neben einer hohen zeitlichen ist für diesen nicht-linearen Prozess ebenfalls eine hohe räumliche Konzentrierung der Photonen notwendig. Technisch wird dies durch ultra-kurz gepulste Infrarot-Laser realisiert, welche monochromatisches,



kohärentes Licht mit einer Pulsdauer im Femtosekunden- und Frequenz im Megahertz-Bereich generieren und mithilfe eines Objektivs hoher numerischer Apertur auf einen Punkt fokussieren (DENK UND SVOBODA, 1997). Da die Zwei-Photonen-Absorption dabei nicht linear von der Anzahl der eingestrahnten Photonen, sondern im Quadrat von der Lichtintensität abhängt, herrscht ausschließlich im Fokus des Laserstrahls eine genügend hohe Photonenflussdichte, um Fluoreszenzmoleküle anzuregen und eine spontane Emission von Licht zu erzeugen. Im Unterschied zur Ein-Photonen-Anregung, bei der alle Fluorophore innerhalb des Lichtkegels angeregt werden, entfällt somit störendes *out of focus* Licht und die Verwendung einer Lochblende im Strahlengang. Durch die fehlende Anregung der Moleküle außerhalb des Fokus erhöht sich jedoch nicht nur der Kontrast, sondern werden auch Bleicheffekte und phototoxische Schäden im umliegenden Gewebe reduziert, was letztlich in einer wesentlich schonenderen Untersuchung lebender, biologischer Strukturen resultiert (DENK ET AL., 1990; POTTER, 1996; CAHALAN ET AL., 2002).

Zusätzlich zum physikalischen Phänomen der Zwei-Photonen-Anregung kann es im Brennpunkt auch zum nicht-linearen optischen Effekt der Frequenzverdopplung des eingestrahnten Lichtes kommen (CAMPAGNOLA ET AL., 2001; ZOUMI ET AL., 2002). Diese als *second harmonic generation (SHG)* bezeichnete Interaktion von längerwelligen Lichtteilchen u.a. mit dem Kollagen der extrazellulären Matrix führt dabei zur Konvertierung dieser in ein einzelnes Photon mit exakt doppelter Frequenz. Das von den Kollagenfasern emittierte Photon entspricht somit genau der Hälfte der anregenden Wellenlänge (MOHLER ET AL., 2003; CAMPAGNOLA UND LOEW, 2003; PANTAZIS ET AL., 2010). Da die Verdopplung der Schwingungsfrequenz des eingestrahnten Lichtes nur bei sehr hohen Lichtintensitäten und Photonendichten auftritt, entsteht diese, wie auch die Zwei-Photonen-Absorption, ebenfalls ausschließlich im Fokus eines ultra-kurz gepulsten Laserstrahls (COHEN, 2010). Die Kombination aus Zwei-Photonen-Absorption und dem *SHG*-Signal ermöglicht eine nicht-invasive, räumlich kolokalisierte Aufzeichnung von Zellen in Verbindung mit dem umliegenden Bindegewebe und liefert somit zusätzliche Informationen über deren Interaktionen innerhalb des Gewebsverbands (GAUDERON ET AL., 2001; ZOUMI ET AL., 2002).

### 3.3.2 Aufbau eines Zwei-Photonen-Mikroskops

Der instrumentelle Aufbau eines Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops ähnelt dem eines konfokalen (DENK ET AL., 1990). Das von einem Laser erzeugte, räumlich und zeitlich kohärente Anregungslicht wird durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur auf einen Punkt der Probe fokussiert und über die im Strahlengang befindlichen, beweglichen

Scanspiegel in dessen Position derart verändert, dass der Fokus durch das Präparat bewegt und dieses gescannt, also Punkt für Punkt abgerastert wird. Durch die Verwendung von ultra-kurz gepulsten Lasern entsteht dabei ausschließlich im Fokuspunkt eine ausreichend hohe Lichtintensität, um den Effekt der Zwei-Photonen-Absorption zu erzeugen (siehe S. 25). Das emittierte Licht wird vom Objektiv gesammelt, über Farbteiler vom Anregungslicht getrennt und, entsprechend seiner Wellenlänge, zu Detektoren geleitet. Bedingt durch die massive Reduktion des *out of focus* Lichtes fallen praktisch nur Photonen aus der Fokusebene auf die Detektoren. Das vom Präparat reflektierte, langwellige Anregungslicht wird dagegen weitestgehend zurück in den Beleuchtungsstrahlengang gelenkt bzw. von Sperrfiltern absorbiert. Photomultiplier, die typischerweise als Detektoren dienen, registrieren die Lichtintensität jedes einzelnen Bildpunktes zeilenweise nacheinander, wodurch ein zweidimensionales Bild eines Objektes generiert wird. Im Unterschied zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie entsteht das vollständige Bild somit nicht parallel durch gleichzeitige Beleuchtung und Betrachtung, sondern wird, bedingt durch den relativ langsamen, zeilenweisen Bildaufbau, erst digital mithilfe einer Datenerfassungssoftware zusammengesetzt (POTTER, 1996).

### 3.3.3 Laser-induzierte Anregung autofluoreszierender Gewebsstrukturen

Aufgrund der hohen Eindringtiefen sowie vergleichsweise geringen phototoxischen Belastungen konnten in den vergangenen Jahren mithilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie eine Vielzahl von dynamischen Prozessen in lebenden Geweben beschrieben werden. Durch die Verwendung exogener Fluoreszenzfarbstoffe sowie genetisch veränderter Tiere konnten beispielsweise Mechanismen der DC bei der Erkennung und Aufnahme von Antigenen aus dem Darmlumen aufgeklärt (CHIEPPA ET AL., 2006; LELOUARD ET AL., 2012) oder Bewegungsmuster und Interaktionen von Lymphozyten mit APC in verschiedenen lymphatischen Geweben visualisiert werden (MILLER ET AL., 2002; LINDQUIST ET AL., 2004; MEMPEL ET AL., 2004; MILLER ET AL., 2004; ZINSELMAYER ET AL., 2005). Neben der spezifischen Markierung unterschiedlicher Zellkompartimente und dem Einsatz transgener Tiere ermöglicht die Zwei-Photonen-Mikroskopie jedoch auch eine Anregung endogener Fluorophore (ZIPFEL ET AL., 2003a). Die Autofluoreszenz basiert dabei hauptsächlich auf der reduzierten Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphats NAD(P)H sowie dem Flavin-Adenin-Dinukleotid FAD (BENNETT ET AL., 1996; PISTON UND KNOBEL, 1999; KÖNIG, 2000; ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2011). Während NAD(P)H vor

allem in den Mitochondrien sowie dem Zytosol vorkommt (PATTERSON ET AL., 2000), findet sich das Flavin-Adenin-Dinukleotid vorwiegend in lysosomalen Membranen (SHIN UND MEGO, 1988; ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2011). Anhand der Verteilung sowie unterschiedlichen spektralen Signatur der Fluorophore können morphologische Differenzierungen zwischen verschiedenen Zelltypen und -organellen erreicht und dynamische Vorgänge ohne zusätzliche Färbungen verfolgt werden.

### **3.4 Experimenteller Versuchsaufbau und Vorgehen**

Die Entwicklung der Zwei-Photonen-Mikroskopie mit ihren vielseitigen, biomedizinischen Anwendungsmöglichkeiten stellte einen bedeutenden Schritt auf dem Gebiet der Intravitalmikroskopie dar (DENK ET AL., 1990). Dabei haben sich die zugrunde liegenden, nicht-linearen Zwei-Photonen-Prozesse aufgrund der hochauflösenden und gewebeschonenden Bildgebung für intravitale Untersuchungen der Dynamik von Immunzellen im intakten Gewebe in den letzten Jahren als zuverlässige Methode etabliert (MILLER ET AL., 2002; MEMPEL ET AL., 2004; CHIEPPA ET AL., 2006; STEVEN UND GEBERT, 2008; KLINGER ET AL., 2012). Der nachfolgend beschriebene, bereits durch Klinger et al. in der AG Gebert etablierte Versuchsaufbau (KLINGER ET AL., 2012) ermöglichte eine hochaufgelöste, multi-dimensionale Aufzeichnung der intestinalen Schleimhaut lebender Mäuse und diente in der vorliegenden Arbeit sowohl der Bestimmung der Epithelzelldichte als auch der Visualisierung des Migrationsverhaltens intraepithelialer Lymphozyten. Anhand des zugrunde liegenden *in vivo* Mausmodells konnten die, innerhalb der Dünndarmschleimhaut stattfindenden, dynamischen Prozesse der Lymphozyten unter physiologischen Bedingungen beobachtet sowie deren Interaktionen mit dem umliegenden Gewebe analysiert werden. Im Folgenden sind das verwendete experimentelle Setup der spektral auflösenden Zwei-Photonen-Mikroskopie beschrieben sowie Verfahren zur Akquirierung und Auswertung der Bilddaten erläutert.

#### **3.4.1 *In vivo* Mausmodell**

Der Untersuchung dynamischer Vorgänge in der Schleimhaut des Dünndarms lagen *in vivo* Versuche der Maus vom Stamm Balb/c zugrunde. Zur Vorbereitung auf die Intravitalmikroskopie wurde den Versuchstieren am Vortag des jeweiligen Experiments das Standard-Pelletfutter entzogen.

#### 3.4.1.1 *Anästhesie*

Die chirurgische Präparation erfolgte unter intraperitonealer Allgemeinanästhesie. Zur Einleitung der Betäubung wurden der Maus 600 µl eines Narkosegemisches aus Fentanyl 0,05 mg/ml (ROTEXMEDICA GmbH, Trittenau, Deutschland), Midazolam 1 mg/ml (ROTEXMEDICA GmbH, Trittenau, Deutschland) und Medetomidin 1 mg/ml (Elanco Animal Health, Bad Homburg, Deutschland) initial i.p. appliziert. Die verabreichte, bei operativen Eingriffen an Nagetieren etablierte Kombinationsanästhesie ist dabei durch eine sedativ-hypnotische, muskelrelaxierende sowie analgetische Wirkung unter weitgehender Vermeidung unerwünschter kardiologischer und respiratorischer Nebenwirkungen charakterisiert. Als Indikator für eine ausreichende Narkosetiefe und den Beginn der Operation diente der Ausfall klassischer Reflexe wie Umdrehreflex, Kornealreflex sowie Zwischenzehenreflex. Durch die Überprüfung des Zwischenzehenreflexes konnte, etwa 20–30 min nach i.p. Injektion, ein ausreichend tiefer Zustand der Empfindungslosigkeit erzielt und somit das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums sichergestellt werden. Mithilfe eines Perfusors (*Syringe Pump, Model 11 Plus*, Harvard Apparatus Inc., Massachusetts, USA) wurde die Narkose über bis zu 8 Stunden hinweg aufrecht gehalten und, durch regelmäßige Überprüfung der Zwischenzehenreflexe und Schnurrhaaraktivität, individuell auf das jeweilige Versuchstier angepasst. Atemdepressionen aufgrund etwaiger Überdosierungen wurden in keinem der durchgeführten Versuche beobachtet – keines der Versuchstiere ist vorzeitig verstorben.

#### 3.4.1.2 *Chirurgische Präparation und Versuchsüberwachung*

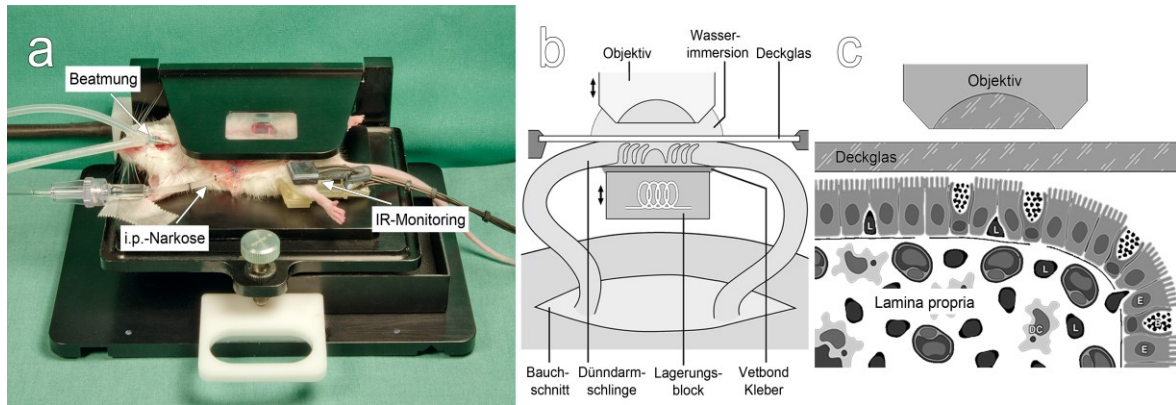
Zur Erhaltung einer konstanten Körperkerntemperatur von 37 °C wurde die sedierte Maus in Rückenlage auf einer speziell für die Intravitalmikroskopie konstruierten, beheizten Mauslagerungsbühne gelagert (Abbildung 3.3 a). Um eine kontinuierliche Beatmung sicherzustellen wurde ein chirurgischer Zugang zur Luftröhre geschaffen, ein Trachealtubus von außen eingebracht und die Maus über ein Beatmungsgerät (MiniVent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik & Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) beatmet. Einige wenige Versuche wurden unter Spontanatmung durchgeführt. Im Anschluss an die Intubation wurde die Bauchwand durch einen paramedianen Hautschnitt freigelegt und die Peritonealhöhle ebenfalls in Längsrichtung eröffnet. Der Dünndarm wurde, ausgehend vom ileozökalen Übergang, in seiner gesamten Länge inspiziert und, abhängig vom Verlauf zuführender Gefäße, eine geeignete Dünndarmschlinge isoliert. Um Bewegungs-

artefakte aufgrund peristaltischer Kontraktionen der glatten Muskulatur zu reduzieren, wurde der Darm mittels Ligaturen jeweils 3–4 cm oral und aboral des aufzuklebenden Abschnitts *in situ* abgebunden und 0,5–1 ml vorgewärmte Ringerlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) in dessen Lumen injiziert. Das dadurch aufgedehnte Darmstück wurde vorsichtig aus der Bauchhöhle auf ein ebenfalls mit 37 °C temperiertes Fingerplättchen verlagert und mithilfe eines Gewebeklebers (3M Vetbond TissueAdhesive, St. Paul, Minnesota, USA) fixiert. Nun konnte das Darmstück mit einer Mikroschere gegenüber dem Mesenterialansatz der Länge nach geöffnet und die luminale Seite vorsichtig an ein darüber befindliches Deckglas gedrückt werden. Je nach Fragestellung wurden dadurch gezielt Darmabschnitte mit oder ohne Peyer-Plaques aufgeklebt und umliegende Zotten untersucht. Die Peyer-Plaques waren dabei als weißlich rund-ovale, von außen durch die Darmwand sichtbare Vorwölbungen zu identifizieren.

Bei allen operativen Schritten wurde stets darauf geachtet, dass die zuführende Blutversorgung des abgebundenen Darmstücks intakt, der eröffnete Darm durch temperierte Ringerlösung kontinuierlich bedeckt gehalten und so vor Austrocknung geschützt bleibt. Einzelne mikrochirurgische Schnitte erforderten die Verwendung einer Stereolupe (Zeiss Stemi 2000-C, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) sowie einer, das OP-Feld ausleuchtenden Kaltlichtquelle (Zeiss KL 2500 LCD, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland).

Der gesamte Aufbau mit Mauslagerungsbühne, Beatmungsgerät und Perfusor wurde anschließend unter dem Zwei-Photonen-Mikroskop platziert (Abbildung 3.3 b und c). Um eine Wärmeabfuhr durch das Wasserimmersionsobjektiv zu verhindern, wurde dieses mithilfe eines Software-gesteuerten Heizrings ausgestattet und auf 37 °C vorgewärmt. Zur Überprüfung physiologischer Versuchsbedingungen wurden die Vitalparameter der Maus (Herzfrequenz, Atemfrequenz, arterielle Sauerstoffsättigung) mithilfe einer IR-Pulsoxymetrie (MouseOx, Starr Life Sciences, Oakmont, USA) aufgezeichnet. Die Messung der partiellen, arteriellen Sauerstoffsättigung diente der routinemäßigen Überwachung der Oxygenierung, der Erkennung einer Hypoxämie sowie gegebenenfalls der Anpassung von Atemfrequenz und Atemzugvolumen. In einigen Versuchen wurde die maschinelle Beatmung unter Aufzeichnung sämtlicher Vitalparameter kurzzeitig abgestellt. Durch einen Abbildungsartefakt strömender Erythrozyten in den versorgenden Kapillaren (siehe S. 50) konnte zusätzlich die Blutversorgung innerhalb des untersuchten Gewebes unter dem Zwei-Photonen-Mikroskop über die Versuchsdauer beurteilt werden (ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2011; KLINGER ET AL., 2012). Das Versuchsende erfolgte durch zervikale Dislokation mit Durchtrennung des Rückenmarks.

Sämtliche *in vivo* Tierversuche (n=41) wurden gemäß den tierschutzrechtlichen Bestimmungen durchgeführt und vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz im Rahmen terminaler Endversuche zu wissenschaftlichen Zwecken nach §8 Abs. 1 TierSchG genehmigt (Aktenzeichen 22-2684-04-02-003/14).



**Abbildung 3.3** Experimenteller Versuchsaufbau zur Untersuchung der murinen Dünndarmschleimhaut *in vivo*. **(a)** Lagerung der anästhesierten, maschinell beatmeten Balb/c Maus auf einer temperierten Mauslagerungsbühne. Über einen intraperitoneal gelegten Perfusorschlauch konnte die Narkose über die Versuchsdauer hinweg aufrecht gehalten werden. Die Vitalparameter wurden mithilfe einer IR-Pulsoxymetrie überwacht. **(b)** Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsaufbaus unterm Zwei-Photonen-Mikroskop. Im Zuge der chirurgischen Präparation wurde eine Dünndarmschlinge aus der Bauchhöhle auf ein beheiztes Fingerplättchen verlagert, der Länge nach eröffnet und mit der luminalen Seite vorsichtig an ein Deckglas gedrückt. **(c)** Schematische Abbildung der, dem Deckglas anliegenden Dünndarmschleimhaut mit Epithel und darunter liegender Lamina propria. Enterozyten (E), Becherzellen (B), Lymphozyten (L) und dendritische Zellen (DC) sind dargestellt.

#### 3.4.2 Intravitale Markierung intraepithelialer Lymphozyten

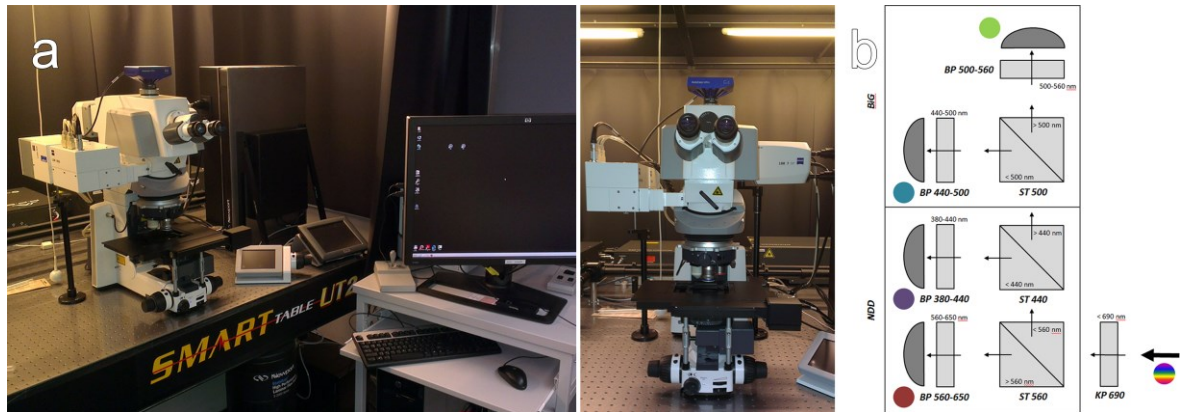
Die *in vivo* Versuche basierten vorwiegend auf der Aufzeichnung von Autofluoreszenz-Signalen. Durch die Verwendung eines spezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpers konnte die Zellmembran intraepithelialer Lymphozyten selektiv markiert, die Autofluoreszenz des Gewebes komplementiert und somit zusätzliche Informationen über Interaktionen mit umliegenden Epithelzellen sowie der Lamina propria gewonnen werden. Dazu wurden im Anschluss an die chirurgische Präparation 40–50 µl eines CD103<sup>+</sup>-FITC Antikörpers (0,5 mg/ml, BD Pharmingen, Rat Anti-Mouse, Clone M290, BD Biosciences), 1:4 verdünnt mit BioWhittaker DPBS (Lonza, Verviers, Belgien), luminal appliziert. Nach 30 min bis 2 h konnte eine ausreichende Membranfärbung einzelner IEL detektiert werden.

Die Fluoreszenzfarbstoff-basierte Intravitalmarkierung sollte dabei möglichst keinen Einfluss auf die Barrierefunktion des Epithels sowie auf die Dynamik und Vitalität der IEL haben.

### 3.4.3 Experimentelles Setup der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die lebende Dünndarmschleimhaut wurde mithilfe eines speziellen Zwei-Photonen-Mikroskops (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) aufgezeichnet. Der experimentelle Aufbau, bestehend aus zwei baugleichen, ultra-kurz gepulsten Titan:Saphir Lasern (Chameleon, Coherent Deutschland GmbH, Dieburg, Deutschland), ermöglichte die simultane Anregung mit zwei Wellenlängen im nahen Infrarot-Bereich zwischen 690 nm und 1010 nm. Die für eine Zwei-Photonen-Absorption benötigten, hohen Photonenflussdichten wurden dabei mit einer Pulsdauer von etwa 100 fs und -repetitionsrate von 80 MHz generiert (DENK ET AL., 1990; ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2011). Über akusto-optische Modulatoren (AOMs) ließ sich die Transmission und damit die Menge des gewebebestrahlenden Laserlichtes regulieren. Die Laserstrahlen wurden über zwei vorgeschaltete Periskop-Systeme mit jeweils in x- und y-Richtung verstellbaren Scanspiegeln sowie über ein Kollimator-Modul mit hintereinander geschalteten, optischen Linsenelementen auf die Hinterlinse des Objektivs ausgerichtet. Die räumliche Fokussierung der eingestrahnten Photonen durch das Objektiv erfolgte mithilfe eines aufrechten Auflichtfluoreszenz-Mikroskops (Axio Examiner, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) von oben auf das Gewebe (Abbildung 3.4 a). Die Kombination aus einem Zeiss 40x/1,1 W LD C-Apochromat Objektiv und Zeiss 63x/1,2 W C-Apochromat Objektiv (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) ermöglichte neben unterschiedlichen Aperturen, Tiefenschärfen, Abbildungsmaßstäben sowie -qualitäten auch variable Arbeitsabstände. Unter der Verwendung von Farbteiler-Spiegeln (AHF Analysentechnik AG, Tübingen) und mehreren Photomultiplier (PMT 1 und 2: *non-descanned* Detektoren, PMT 3 und 4: Bi-GaAsP-Detektoren, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) konnten unterschiedliche Wellenlängenbereiche der emittierten Fluoreszenz simultan und spektral getrennt detektiert werden. Die dazu verwendeten, optischen Bandpassfilter wurden vor den Detektoren platziert und ließen selektiv jeweils nur Fluoreszenzlicht eines bestimmten, spektral einige hundert Nanometer vom Anregungslicht entfernt liegenden Wellenlängenbereiches passieren. Die Aufteilung der Fluoreszenz auf die Spektralkanäle erfolgte von 380–440 nm, 440–500 nm, 500–560 nm sowie 560–650 nm (Abbildung 3.4 b). Reflexi-

onen des längerwelligen Anregungslichtes konnten somit blockiert sowie unterschiedliche spektrale Informationen während des Scanprozesses gleichzeitig und getrennt voneinander in 4 verschiedenen Kanälen aufgezeichnet werden.



**Abbildung 3.4** Experimentelles Setup der Zwei-Photonen-Mikroskopie **(a)** Sämtliche optische Bauelemente lagerten auf einem schwingungsgedämpften Tisch **(b)** Photomultiplier sammeln und verstärken als Sekundärelektronenvervielfacher die einfallenden Photonen, erzeugen selbst jedoch noch kein Bild. Es werden lediglich Lichtintensitäten gemessen. Da selbst bei einer Anregung in einem sehr engen Wellenlängenbereich Fluoreszenz in mehreren Farben entsteht, wurde das Licht durch optische Bandpassfilter gefiltert und auf mehrere Detektoren aufgeteilt. Farbteiler-Spiegel und Bandpassfilter wurden in geeigneter Weise derart in Filterwürfel zusammengefasst, dass durch die Verwendung von 4 PMTs 4 selektierte Wellenlängenbereiche parallel detektiert werden konnten. Im ersten Kanal wurden Wellenlängen von 380–440 nm, im zweiten von 440–500 nm, im dritten 500–560 nm und im vierten Kanal Wellenlängen von 560–650 nm aufgezeichnet. Die Zuordnung von Falschfarben zur Monitordarstellung erfolgte digital im Anschluss an das aufgezeichnete Bild.

Der gesamte Aufbau lagerte auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport Stabilizer S-2000 Series, Irvine, California, USA), um Schwingungen und Erschütterungen von außen entgegenzuwirken und die optischen Bauelemente oberhalb der Tischplatte (Newport Smart Table UT2, Irvine, California, USA) mechanisch stabil zu halten. Über eine Belüftungsanlage konnte die Temperatur des Raumes stets konstant gehalten und somit ein Dejustieren der Strahlengänge durch Erwärmung der Aggregate verhindert werden.

#### 3.4.4 Akquirierung von Datensätzen

Die Software ZEN 2012 SP5 *black edition* (Version 14.0.0.0–14.0.1.201, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) erlaubte sowohl die Konfiguration und Steuerung der optischen Komponenten über eine Benutzeroberfläche, als auch die vierdimensionale (x, y, z sowie Zeit t) Erfassung und Betrachtung der digital erzeugten Mehrkanalbilder.



Zur Generierung von Autofluoreszenz-Signalen wurden die Anregungswellenlängen 710 nm und 725 nm verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC wurde mit den Wellenlängen 755 nm sowie zusätzlich mit 930 nm angeregt. Die Darstellung der Bildfeldgröße variierte zwischen 256x256, 400x400, 512x512 und 1024x1024 Pixel. Neben einzelnen 2D-Aufnahmen wurden 2D-Zeitserien, 3D-Bildstapel sowie 3D-Bildstapel als Zeitserien (3D-Zeitserien) über einen Zeitraum von 2–90 min und mit einer zeitlichen Auflösung von 8–32 sec aufgenommen. Je nach Fragestellung wurde dabei mit einer Scangeschwindigkeit zwischen 240 msec und 13,15 sec pro Einzelbild aufgezeichnet. Lediglich ein kleiner, optimal eingestellter Bereich erlaubte die Aufzeichnung intravitaler Gewebe unter Minimierung phototoxischer Schädigungen. Während ein schnelles Scannen einzelner Bildausschnitte die Bestrahlungsintensität für das zu untersuchende Gewebe erheblich reduziert, ermöglicht eine langsamere Aufnahmegeschwindigkeit und damit längere Pixelverweilzeit dagegen das Einfangen von mehr Photonen pro Bildpunkt und somit ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis (*SNR*). Das *SNR* kann zudem wohl über die Abnahme der Beschleunigungsspannung der Photomultiplier sowie maßgeblich über eine zunehmende Laserintensität optimiert werden. Da ein niedrigerer *Gain* jedoch weniger Helligkeit bietet, und eine Erhöhung der Laserleistung von 1 auf 2% aufgrund des quadratischen Zusammenhangs zwischen Anregung und Emission bereits mit einer Vervierfachung der Anregungsintensität einhergeht, erforderte insbesondere die *in vivo* Erfassung multidimensionaler Zwei-Photonen-Bilddaten eine zugleich hochauflösende wie auch gewebeschonende Konfiguration mit einer möglichst optimalen Signal-Rausch-Charakteristik (ZINSELMAYER ET AL., 2009). Für die Aufzeichnungen der lebenden Dünndarmschleimhaut wurden ein Detektor *Gain* von 500–650 V sowie Laserintensitäten von 1,1 bis maximal 4,5% gewählt.

### 3.4.5 Berechnung von Bestrahlungsintensitäten

Um die phototoxische Belastung durch die Laserstrahlen einschätzen und gering halten zu können, wurden Bestrahlungsintensitäten berechnet. Durch den Einsatz eines spezialisierten Laserleistungsmessgeräts (Coherent FieldMate, Wilsonville, USA) wurde die Lichtintensität in der Objektebene kalibriert und die Gewebsbelastung unter Zuhilfenahme verschiedener Parameter ermittelt. Neben der verwendeten Wellenlänge, der Laserleistung hinter den AOMs sowie der Transmission von Mikroskop und Objektiv lagen der Berechnung der Bestrahlungsdichte im Raum ( $\text{Ws/mm}^3$ ) Größen wie die Pixelverweilzeit, Pixelgröße sowie der Abstand der optischen Schnitte in *z* zugrunde. Zur Quantifizierung der

phototoxischen Belastung wurde der Zusammenhang zwischen Bestrahlungsdichte und dem Geschwindigkeitsabfall der intraepithelialen Lymphozyten für einzelne Datensätze separat bestimmt und grafisch miteinander verglichen. Aus den Mittelwerten der, über drei Zeitpunkte gemittelten Anfangs- sowie Endgeschwindigkeiten von mindestens je 10 IEL wurde der Abfall berechnet und nachfolgend mit der Zeit, den Zeitpunkten oder der verwendeten Bestrahlungsdichte ins Verhältnis gesetzt.

### 3.4.6 Aufbereitung und Auswertung multidimensionaler Bilddaten

#### 3.4.6.1 Bildverarbeitung

Trotz der hohen Photonenflussdichten innerhalb des Fokus ist die Wahrscheinlichkeit einer nahezu gleichzeitigen Absorption zweier Photonen infolge einer Zwei-Photonen-Anregung eher gering (CAHALAN ET AL., 2002). Da somit lediglich eine geringe Anzahl von emittierten Lichtteilchen pro Bildpunkt zum bildgebenden Fluoreszenz-Signal beiträgt, bedingen reduzierte Anregungsleistungen sowie erhöhte Scangeschwindigkeiten eine deutliche Verschlechterung der Signal-Rausch-Charakteristik des aufgezeichneten Signals (BÖLKE ET AL., 2014). Zudem ließen sich die IEL aufgrund ihrer geringen Autofluoreszenz nur schwer vom umliegenden Gewebe abgrenzen. Die beschriebenen, eingeschränkten Möglichkeiten zur Erhöhung der Signalintensität resultierten daher, insbesondere bei der Verfolgung dynamischer Prozesse innerhalb des lebenden Dünndarmepithels, in einem deutlich schlechteren *SNR* und damit in einer erschwerten manuellen Auswertung einzelner Zeitpunkte. Zur Verbesserung der Bildqualität sowie Erkennbarkeit relevanter Strukturen wurde, im Anschluss an die Aufzeichnung und Speicherung der Bilddaten, eine speziell für die Datensätze der Zwei-Photonen-Mikroskopie optimierte Methode zur Rauschsignal-unterdrückenden Rekonstruktion des unverfälschten Signals der Bilddaten durchgeführt. Anhand dieser Algorithmen-basierten Vorverarbeitung der Datensätze konnten störende Rauschartefakte reduziert sowie die Bildqualität unter Erhalt relevanter Bildinformationen verbessert werden (BÖLKE ET AL., 2014).

#### 3.4.6.2 Visualisierung erstellter Bilddaten

Zur Visualisierung und Auswertung der Daten intravitaler Aufnahmen wurde die Software Imaris (Version 7.7.2–8.3.1, Bitplane AG, Zürich, Schweiz) verwendet. Zusätzlich zu den Rohdaten wurden die rauschbefreiten Bilddaten in das Analyse-Programm importiert und in die Darstellung einbezogen. Mithilfe des ImageJ Plug-Ins StackReg (THÉVENAZ ET AL.,

1998) konnten Einzelbilder in x- und y-Richtung auf nachfolgend aufgezeichnete ausgerichtet, ein Auswandern des Fokus innerhalb multidimensionaler Datensätze korrigiert und somit Immunzellbewegungen im dreidimensionalen Schnitt über die Zeit beobachtet und quantifiziert werden. Zur Nachbearbeitung und Bildoptimierung der Drift-korrigierten 3D-Zeitserien wurden Werte für die minimale und maximale Helligkeit sowie den Tonwertverlauf jedes einzelnen Spektralkanals angepasst, und so ein optimaler Kontrast erreicht. Das Autofluoreszenz-Signal wurde üblicherweise in Grauwerten dargestellt. Lediglich bei der Darstellung Fluoreszenzfarbstoff-basierter Daten wurden den verwendeten Spektralkanälen Falschfarben zugeordnet. Für die detektierten Autofluoreszenz-Signale der ersten beiden spektralen Kanäle (380–500 nm) wurde dabei blau gewählt, das FITC-Signal sowie lysosomale Zellkompartimente im dritten Spektralkanal (500–560 nm) dagegen grün dargestellt. Aufgrund der Überlagerung der Wellenlängenbereiche des vierten Kanals (560–650 nm) mit dem, innerhalb des Gewebes gestreuten Anregungslicht wurde der langwelligste Detektionsbereich für die Aufnahme und Auswertung der Daten nicht mit einbezogen.

#### *3.4.6.3 Datenanalyse*

Neben einzelnen Bildausschnitten konnten in der Imaris-Software 3D-Bildstapel als Volumina rekonstruiert und 3D-Zeitserien visualisiert werden. Dies ermöglichte zusätzlich zur Darstellung der Morphologie der Dünndarmschleimhaut auch die Auswertung dynamischer Prozesse mit hoher zeitlicher Auflösung. Anhand der aufgezeichneten 3D-Zeitserien konnten insgesamt 10.556 IEL verfolgt und deren Dynamik durch Betrachten einzelner Fokusebenen sowie vorangegangener bzw. nachfolgender Zeitpunkte analysiert werden. Für jede Fokusebene sowie jeden Zeitpunkt erfolgte somit eine separate manuelle Auswertung. Lediglich Zellen, die innerhalb des Epithels über mehrere Zeitpunkte visuell verfolgt werden konnten, wurden in die Auswertung einbezogen. Zur Quantifizierung der Zellbewegungen wurden die xyz-Koordinaten des Zellmittelpunktes markierter IEL zu jedem Zeitpunkt in die Software IBM SPSS Statistics 21 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) importiert und mithilfe der Raumdiagonale sowie jeweiligen Zeitkonstante die zurückgelegten Entfernungen pro Minute berechnet. Darüber hinaus wurden weitere Migrationsparameter wie Entfernungsrates, Abweichungsindex sowie Epithelzell-Kontakte einzelner Immunzellpfade ermittelt (SUMEN ET AL., 2004). Separate Auswertungen unter Verwendung von 3D-Bildstapeln mit einem definierten Bildfeld von 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  er-

laubten die Quantifizierung unterschiedlicher Zelltypen innerhalb des Darmepithels und somit Aussagen über das numerische Verhältnis intraepithelialer Lymphozyten zu Epithelzellen. Für die grafische Darstellung von Langzeitserien wurden einzelne, zeitlich aufeinander folgende Fokusebenen als Bildausschnitte in Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) eingelesen sowie in Form von Movies im avi-Format gespeichert.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software IBM SPSS Statistics 21 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland). Die quantitativen Analysen erfolgten in Microsoft Excel (Version 2010, Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben, wobei sich n auf die Anzahl der Werte bzw. Messungen bezieht. Zur Überprüfung der Daten auf statistische Signifikanz wurden der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben sowie der t-Test verwendet. Unterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn  $p < 0,05$  ist, d.h. die Irrtumswahrscheinlichkeit für die zugrunde gelegte Aussage unter 5% liegt. Sie wurden als hochsignifikant bezeichnet, sobald  $p < 0,001$  ist.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Morphometrie der Dünndarmschleimhaut

Die spezielle Morphologie des Dünndarms steht in direktem Zusammenhang mit dessen funktionellen Anforderungen. So hängt die Resorptionskapazität für Nährstoffe maßgeblich von der inneren Oberfläche der Schleimhaut ab, welche sich durch das charakteristische Vorhandensein permanenter Schleimhautfalten, blatt- bis fingerförmiger Zotten und apikaler Mikrovilli auf den Epithelzellen um ein Vielfaches vergrößert darstellt (FISHER UND PARSONS, 1950; LORENZ-MEYER ET AL., 1976; TRIER UND MADARA, 1981). Ausreichend quantitative Angaben über die Dimensionen der murinen Resorptionsfläche sowie den tatsächlichen Vergrößerungsfaktor der Dünndarmschleimhaut der Maus fehlen jedoch bislang.

Da kaum Untersuchungen zur Gesamtoberfläche einer gesunden Dünndarmschleimhaut der Maus existieren, wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit neben der Anzahl und Geometrie intestinaler Zotten auch die der Mikrovilli innerhalb verschiedener Darmabschnitte licht- und elektronenmikroskopisch analysiert, die stereologisch erhobenen Daten auf den gesamten Dünndarm extrapoliert, und daraus letztlich der Vergrößerungsfaktor sowie die absolute Fläche der resorbierenden Dünndarmschleimhaut ermittelt.

#### 4.1.1 Länge und Fläche des Dünndarms

Zur Quantifizierung der inneren Oberfläche der Darmschleimhaut wurde der Dünndarm der Maus *ex vivo* analysiert (n=6). Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, erfolgte die Gesamtlängenmessung unmittelbar im Anschluss an die luminale Fixation des komplett herauspräparierten Dünndarms. Die makroskopische Beurteilung der Dünndarmlänge ergab im Mittel 44,1 cm ( $SD \pm 0,6$  cm). Nach Durchtrennung der Darmwand entlang der mesenterialen Aufhängung wurde der Dünndarm, mit der luminalen Seite nach oben, auf einer Paraffin-beschichteten Unterlage ausgebreitet und in Abhängigkeit seiner Gesamtlänge in vier Abschnitte – den duodeno-jejunalen Übergang, das Jejunum, den jejun-ilealen Übergang sowie das terminale Ileum – unterteilt. Da der Durchmesser und somit auch die Darmbreite des longitudinal eröffneten Dünndarms variierte, wurde der Flächen-

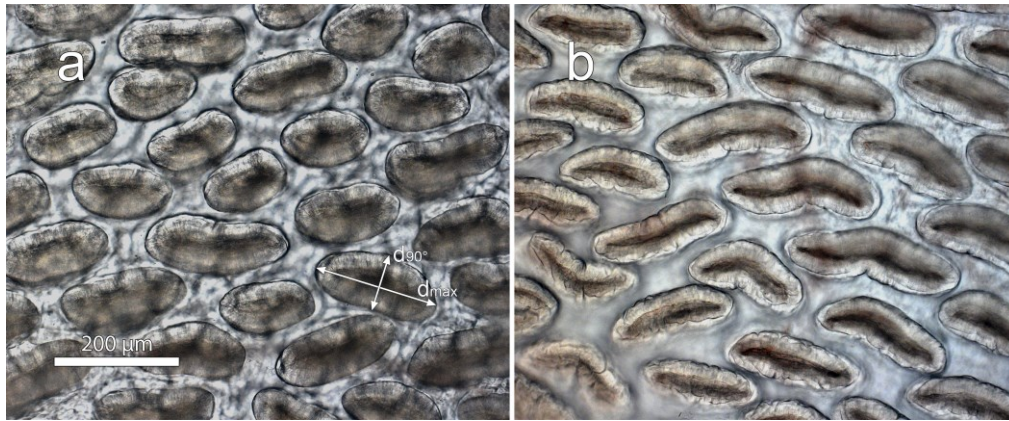
inhalt aus dem Integral der Länge und Breite der vorher festgelegten Dünndarmabschnitte bestimmt und mit durchschnittlich  $30,6 \text{ cm}^2$  ( $SD \pm 2,5 \text{ cm}^2$ ) gemessen. Die planen, annähernd rechteckigen Dünndarmflächen dienten im Weiteren jeweils als Ausgangswert der inneren Oberflächenvergrößerung.

#### 4.1.2 Vergrößerung der inneren Oberfläche

Die Vergrößerung der inneren Dünndarmoberfläche wird vor allem durch die Anzahl und Geometrie der Zotten sowie der Mikrovilli der Epithelzellen bestimmt. Um die Morphologie der intestinalen Schleimhaut sowie deren Resorptionsfläche zu quantifizieren, wurden charakteristische Parameter anhand der entnommenen Gewebeproben aus den beschriebenen Dünndarmabschnitten systematisch analysiert. Die Peyer-Plaques stellten sich als weißlich aufgetriebene, rundlich bis ovale Vorwölbungen der Dünndarmwand mit scharfer Abgrenzung zur umgebenden Schleimhaut dar und wurden nicht in die Quantifizierung der intestinalen Oberfläche einbezogen. Die stereologische Untersuchung der Zottenanzahl, -länge sowie basalen Querschnittsfläche innerhalb der verschiedenen Dünndarmabschnitte erfolgte mithilfe lichtmikroskopischer Aufnahmen, die Geometrie und Flächendichte der Mikrovilli wurde elektronenmikroskopisch bestimmt. Die Entwicklung geometrischer Modelle ermöglichte die Bestimmung der Zotten- und Mikrovilli-Oberflächen sowie die mathematische Annäherung an die Gesamtoberfläche der murinen Dünndarmschleimhaut.

##### 4.1.2.1 Morphologie und Morphometrie intestinaler Zotten

Die Zotten stellen makroskopisch sichtbare, blatt- bis fingerförmige Ausstülpungen der Lamina propria dar, wobei deren Länge und Form neben Spezies-spezifischen Unterschieden auch eine große Variabilität innerhalb der verschiedenen Abschnitte des Dünndarms aufweist (TRIER UND MADARA, 1981; NEUTRA, 1988; KOMURO ET AL., 1994). Ins Lumen des Dünndarms ragend, erstreckt sich deren regelmäßige Anordnung über die gesamte Dünndarmoberfläche. Lediglich vereinzelt vorkommende, Zotten-freie Areale werden von kuppelförmigen Einzelnoduli eines Peyer-Plaques eingenommen. Da die histologische Aufarbeitung mit einer praktisch unvermeidlichen Schrumpfung des Gewebes einhergeht, wurden die stereologischen Parameter zur Bestimmung der Geometrie intestinaler Zotten unmittelbar an frisch fixierten, ungefärbten Präparaten erfasst.



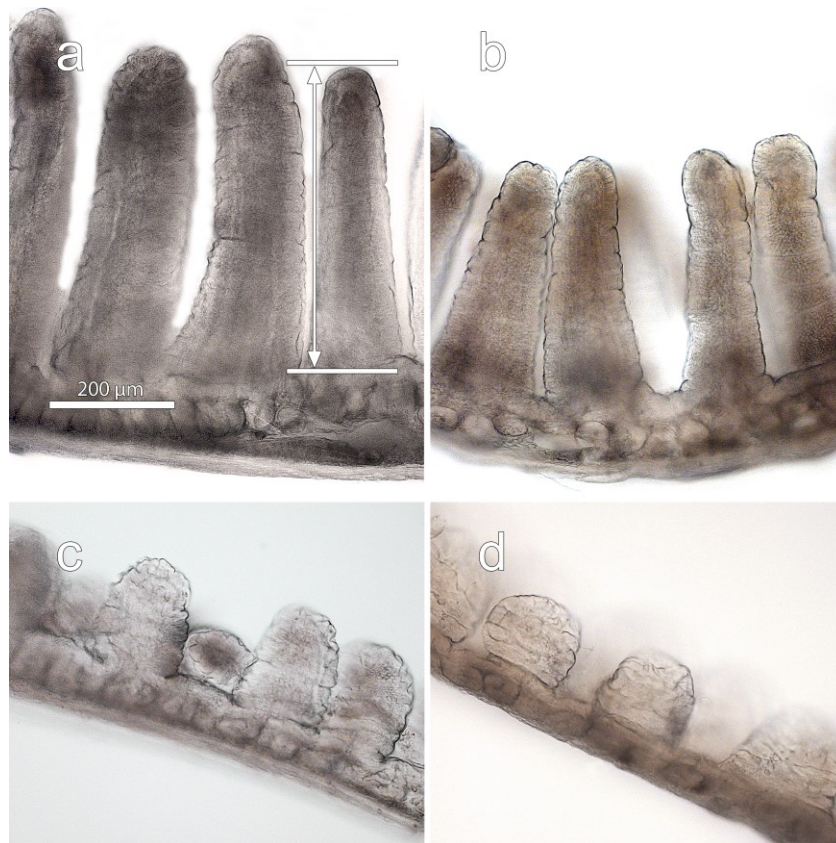
**Abbildung 4.1** Lichtmikroskopische Durchlichtaufnahmen basaler Zottenquerschnitte knapp oberhalb der Kryptenebene. **(a)** Ausschnitt aus dem Bereich des jejunum-ilealen Übergangs sowie **(b)** terminalen Ileums. Die eingezeichneten Linien zeigen den Maximal- ( $d_{\max}$ ) sowie Querdurchmesser ( $d_{90^\circ}$ ) von Zotten. Die Zottengrundrisse sind unterschiedlich groß und weichen stark von der Kreisform ab. Die Trennung zwischen Zottenstroma und dem, die Lamina propria umgebenden Zottenepithel ist deutlich zu erkennen. Zwischen den Zottengrundflächen zeichnen sich teilweise die als helle Ringe erscheinenden Krypten ab.

Die lichtmikroskopischen Durchlichtaufnahmen von der Serosaseite des Darms zeigen die Querschnitte basaler Zotten im Bereich des jejunum-ilealen Übergangs sowie des terminalen Ileums (Abbildung 4.1). Durch Zählung der Zotten innerhalb definierter Bildausschnitte wurde die Zottendichte (Anzahl pro  $\text{mm}^2$ ) mit durchschnittlich 40,4 Zotten ( $SD \pm 5,9$ ) pro  $\text{mm}^2$  bestimmt, und unter Berücksichtigung des ermittelten Flächeninhalts auf eine absolute Anzahl von 123.070 ( $SD \pm 9960$ ) pro Dünndarm hochgerechnet. Die mittlere Zottendichte variiert dabei innerhalb der untersuchten Dünndarmabschnitte nach anscheinend regelmäßigem Muster. So steigt die Anzahl der Zotten von oral nach aboral stetig an und ist am jejunum-ilealen Übergang mit 48,6 Zotten ( $SD \pm 7,6$ ) pro  $\text{mm}^2$  am größten. Im terminalen Ileum nimmt die Zottendichte wiederum stark ab. Mit durchschnittlich 34,9 Zotten ( $SD \pm 4,8$ ) pro  $\text{mm}^2$  weist der duodeno-jejunale Übergang jedoch die geringste Dichte auf (Tabelle 4.1).

Neben der Anzahl wurde anhand der Durchlichtaufnahmen ebenso die Morphologie der basalen Querschnittsfläche einzelner Zotten quantifiziert. Die Form der Zotten variiert je nach Dünndarmabschnitt von nahezu rund bis elliptisch bzw. annähernd nierenförmig. Zusätzlich zu dem, sich voneinander unterscheidenden Maximal- ( $d_{\max}$ ) und Querdurchmesser ( $d_{90^\circ}$ ) einzeln quantifizierter Zottenbasen entlang des gesamten Dünndarms konnte der jeweilige Zottenumfang ermittelt werden (Tabelle 4.1). Mit durchschnittlich 182  $\mu\text{m}$  ( $SD \pm 36 \mu\text{m}$ ) in Längs- und 109  $\mu\text{m}$  ( $SD \pm 11 \mu\text{m}$ ) in Querausdehnung beträgt der Umfang

der basalen Querschnittsfläche im Mittel  $475 \mu\text{m}$  ( $SD \pm 72 \mu\text{m}$ ). Im Vergleich der einzelnen Dünndarmabschnitte unterscheiden sich die Querdurchmesser dabei nur gering, wobei die breitesten Zotten im Duodenum und Jejunum liegen. Der Maximaldurchmesser nimmt mit zunehmender Entfernung vom Magenausgang ab, ist im terminalen Ileum jedoch wieder signifikant größer als im Bereich des jejuno-ilealen Übergangs ( $p < 0,001$ ). Entsprechend weist der Zottenumfang im duodeno-jejunalen Übergang mit durchschnittlich  $526 \mu\text{m}$  ( $SD \pm 73 \mu\text{m}$ ) sein Maximum auf.

Die Bestimmung der Zottenhöhe erfolgte an Längsschnitten der einzelnen Darmabschnitte. Quer zur Längsachse des Dünndarms angeordnet, unterscheidet sich die Größe und Form der Zotten entlang ihrer Ausdehnung vom Magenausgang bis zum ileozäkalen Übergang erheblich.



**Abbildung 4.2** Längsschnitte der Dünndarmzotten (a) am duodeno-jejunalen Übergang, (b) im Jejunum, (c) am jejuno-ilealen Übergang sowie (d) im terminalen Ileum. Die Zotten der verschiedenen Dünndarmabschnitte weisen unterschiedliche Längen auf und variieren stark in ihrer Form. Die Zottenspitzen sind stumpf abgerundet.



Die Vielfalt der Zottenform reicht je nach Dünndarmabschnitt von finger- bis zungenförmig (Abbildung 4.2). Im Bereich des duodeno-jejunalen Übergangs und Jejunums sind die Zotten dicht angeordnet und von fingerförmiger Gestalt. Im jeuno-ilealen Übergang sowie dem terminalen Ileum sind die Zotten dagegen vorwiegend zungenförmig ausgebildet – mit verdickter, plumper Zottenbasis sowie stumpf abgerundeter, kammähnlicher Zottenspitze. Entlang ihres longitudinalen Verlaufs bleiben die Zotten aller Dünndarmabschnitte jedoch annähernd gleichmäßig breit. Die Zottenhöhe wurde von der Basis im Bereich der luminalen Kryptenmündungen bis zur Zottenspitze gemessen, wobei lediglich die exakt mittig und längs orientierten Zotten in die Auswertung einbezogen wurden. Im duodeno-jejunalen Übergang zeigen sich die längsten Zotten, welche eine durchschnittliche Höhe von  $508\ \mu\text{m}$  ( $SD \pm 81\ \mu\text{m}$ ) aufweisen. Im terminalen Ileum finden sich mit einer gemittelten Länge von  $127\ \mu\text{m}$  ( $SD \pm 35\ \mu\text{m}$ ) dagegen die kürzesten Zotten. Die deutliche Abnahme der Zottenlänge mit zunehmendem Verlauf nach aboral trat bei allen untersuchten Mäusen auf und ist statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) (Tabelle 4.1). Anhand der prozentualen Abweichungen der Zottenhöhe zeigt sich, dass die Länge duodeno-jejunaler Zotten keiner wesentlich höheren Variabilität unterliegt als die aboraler Zotten. Die geringere Streuung innerhalb jeuno-ilealer und ilealer Darmabschnitte deutet somit auf keine größere Ähnlichkeit aboraler Zottenlängen hin.

Mit Hilfe der ermittelten morphometrischen Parameter wurde im Anschluss die Oberfläche von Einzelzotten in den vier Dünndarmbereichen berechnet. Unter der Annahme eines vereinheitlichten, geometrischen Zottenmodells mit elliptischem Zylinder und einem halbierten, triaxialen Ellipsoid als Zottenspitze ergibt sich eine durchschnittliche Zottenoberfläche von  $0,156\ \text{mm}^2$  ( $SD \pm 0,089\ \text{mm}^2$ ). Bedingt durch die abschnittsspezifische Zottenhöhe sowie den -umfang ist die Oberfläche einzelner Zotten im duodeno-jejunalen Übergang mit  $0,275\ \text{mm}^2$  ( $SD \pm 0,026\ \text{mm}^2$ ) am größten, und nimmt zum Ileum hin kontinuierlich bis auf  $0,064\ \text{mm}^2$  ( $SD \pm 0,016\ \text{mm}^2$ ) ab. Mit der sich unterscheidenden Zottenoberfläche variiert auch der Vergrößerungsfaktor der Schleimhaut innerhalb der einzelnen Dünndarmabschnitte. Unter Berücksichtigung der berechneten Zottenzahl und gemittelten -oberfläche sowie der miteinbezogenen Zotten-freien Fläche zwischen den Zottenbasen konnte die Gesamtvergrößerung der Dünndarmschleimhaut in Bezug auf die Fläche der Serosa bestimmt und ein Faktor von  $6,7$  ( $SD \pm 0,6$ ) ermittelt werden. So vergrößert sich die Resorptionsfläche durch die Ausbildung von Zotten von durchschnittlich  $30,6\ \text{cm}^2$  ( $SD \pm 2,5\ \text{cm}^2$ ) auf etwa  $203\ \text{cm}^2$  ( $SD \pm 16\ \text{cm}^2$ ).

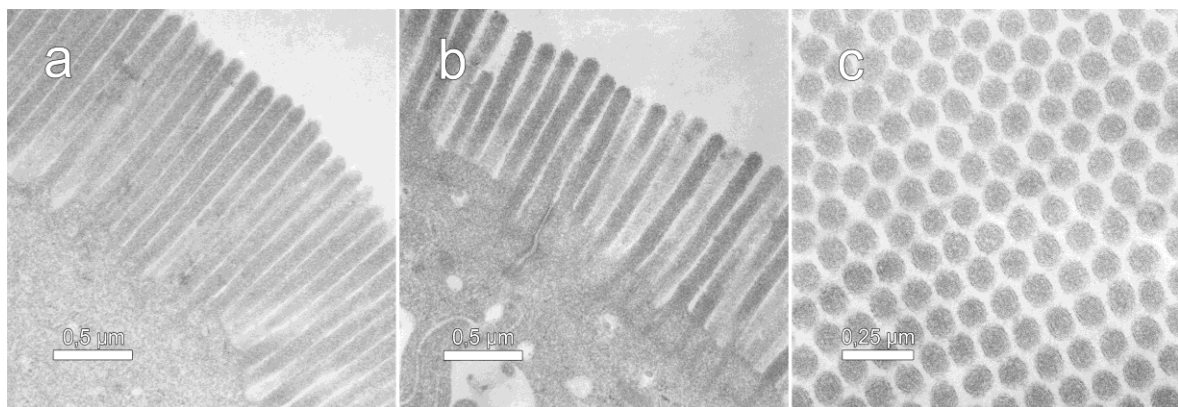
	Duodeno- jejunaler Übergang		Jejunum		Jejuno- ilealer Übergang		Ileum		Mittelwert
Anzahl Zotten (pro mm <sup>2</sup> )	34,9 (SD ± 4,8)	n=38	40,2 (SD ± 5,4)	n=39	48,6 (SD ± 7,6)	n=38	37,9 (SD ± 3,3)	n=38	40,4 (SD ± 5,9)
Längsdurchmesser (d <sub>max</sub> )	207,3 µm (SD ± 36,0)	n=429	186,0 µm (SD ± 34,6)	n=554	160,1 µm (SD ± 26,5)	n=639	183,6 µm (SD ± 31,7)	n=512	181,9 µm (SD ± 36,0)
Querdurchmesser (d <sub>90°</sub> )	111,2 µm (SD ± 10,3)	n=429	111,0 µm (SD ± 9,3)	n=554	105,9 µm (SD ± 9,8)	n=639	107,4 µm (SD ± 12,8)	n=512	108,7 µm (SD ± 10,8)
Perimeter	525,8 µm (SD ± 72,8)	n=429	485,2 µm (SD ± 69,0)	n=554	430,8 µm (SD ± 53,8)	n=639	475,5 µm (SD ± 62,9)	n=512	474,7 µm (SD ± 72,4)
Zottenhöhe	508,3 µm (SD ± 81,3)	n=165	401,2 µm (SD ± 50,5)	n=216	203,3 µm (SD ± 34,9)	n=187	126,9 µm (SD ± 35,4)	n=140	319,6 µm (SD ± 155,4)
Querschnittsfläche	0,018 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,004)	n=429	0,016 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,004)	n=554	0,013 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,003)	n=639	0,015 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,003)	n=512	0,015 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,004)
Oberfläche der Zotten	0,275 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,026)		0,196 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,021)		0,088 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,018)		0,064 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,016)		0,156 mm <sup>2</sup> (SD ± 0,089)

**Tabelle 4.1** Stereologische Parameter der intestinalen Zotten aller untersuchten Versuchstiere. Pro Dünndarmabschnitt wurden 38 bis 39 Bildausschnitte in die statistische Auswertung einbezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) sind angegeben. n steht für die Anzahl der Durchlichtaufnahmen bzw. morphometrisch untersuchten Zotten.

#### 4.1.2.2 Morphometrie des Bürstensaums

Neben den Zotten tragen vor allem die Mikrovilli der Enterozyten entscheidend zur Vergrößerung der inneren Dünndarmoberfläche bei. In ihrer Gesamtheit den Bürstensaum bildend, stellen sich die Mikrovilli elektronenmikroskopisch als stäbchenförmige, unverzweigte Ausstülpungen der apikalen Zellmembran dar. Das Innere der Mikrovilli ist über mehrere, längs gerichtete Bündel stabilisierender Aktinfilamente im *terminal web* der Enterozyten verankert. Die Plasmamembran der Mikrovilli ist hochspezialisiert und enthält zahlreiche, der enzymatischen Verdauung und Resorption dienende Glykoproteine. Somit vergrößern die Mikrovilli die Epithelzelloberfläche und erhöhen dabei in erheblichem Maße die Resorptionskapazität des Dünndarmepithels.

Die Morphometrie der apikalen Oberfläche intestinaler Epithelzellen wurde mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt. Anhand verschiedener stereologischer Parameter konnte die Oberfläche der Mikrovilli berechnet, und über deren Flächen-dichte auf den Gesamt-Vergrößerungsfaktor der murinen Dünndarmschleimhaut geschlossen werden. Aufgrund ihrer vernachlässigbar geringen Anzahl im intestinalen Epithel wurden die schleimbildenden, Mikrovilli-freien Becherzellen nicht in die Berechnung einbezogen. Die TEM-Aufnahmen zeigen die apikale Epithelzelloberfläche mit deren zahlreichen, dicht stehenden Mikrovilli in paralleler Anordnung sowohl im Längs- als auch im Querschnitt (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3** Morphometrie der Mikrovilli. **(a, b)** TEM-Längsschnitt durch den Bürstensaum von Enterozyten aus dem Jejunum von NMRI Mäusen. Die Länge der Mikrovilli beträgt durchschnittlich 897 nm ( $SD \pm 234$ ), wobei diese entlang der apiko-basalen Zottenachse stark variiert. **(c)** Querschnitt durch Mikrovilli des Bürstensaums. Gleichmäßig über die apikale Oberfläche der Enterozyten verteilt, ragen etwa 64,1 ( $SD \pm 4,5$ ) Mikrovilli pro  $\mu m^2$  ins Dünndarlumen.

Gleichmäßig über die gesamte apikale Epithelzelloberfläche verteilt, ragen im Mittel 64,1 ( $SD \pm 4,5$ ) Mikrovilli pro  $\mu\text{m}^2$  ins Darmlumen. Bezogen auf die mittlere Zottenoberfläche entspricht dies etwa  $10^7$  Mikrovilli pro Zotte. Der Durchmesser der Mikrovilli beträgt durchschnittlich 128 nm ( $SD \pm 32 \text{ nm}$ ), wobei lediglich kreisrunde, annähernd orthogonal getroffene Querschnitte in die statistische Auswertung einbezogen wurden. Die Länge der Mikrovilli wurde anhand von Längsschnitten ermittelt. Entlang der apiko-basalen Zottenachse variiert die Höhe der Mikrovilli von 531 nm ( $SD \pm 66 \text{ nm}$ ) in Kryptennähe bis durchschnittlich 1000 nm ( $SD \pm 143 \text{ nm}$ ) im Bereich der Zottenspitze (Tabelle 4.2). Diese morphologischen Unterschiede sind sowohl innerhalb der einzelnen Versuchstiere als auch der untersuchten Dünndarmabschnitte festgestellt und statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Für die mathematische Annäherung an die Oberfläche eines Mikrovillus wurde die gemittelte Höhe von 897 nm ( $SD \pm 234 \text{ nm}$ ) angenommen. Unter Verwendung eines geometrischen Modells mit einem gleichförmigen Zylinder und einer Halbkugel als apikale Kappe ergibt sich eine durchschnittliche Mikrovillus-Oberfläche von  $0,36 \mu\text{m}^2$ . Mit  $0,40 \mu\text{m}^2$  ist die Oberfläche eines Einzel-Mikrovillus in der Nähe der Zottenspitze deutlich größer und nimmt zur Basis der Zotten hin bis auf  $0,21 \mu\text{m}^2$  ab.

	Mittelwerte	
Anzahl Mikrovilli (pro $\mu\text{m}^2$ )	64,1 ( $SD \pm 4,5$ )	n=18
Durchmesser	0,128 $\mu\text{m}$ ( $SD \pm 0,032$ )	n=76
Länge der Mikrovilli	apikal 1,000 $\mu\text{m}$ ( $SD \pm 0,143$ )	n=216
	basal 0,531 $\mu\text{m}$ ( $SD \pm 0,066$ )	n=61
Querschnittsfläche	0,014 $\mu\text{m}^2$ ( $SD \pm 0,007$ )	n=76
Oberfläche der Mikrovilli	0,359 $\mu\text{m}^2$	

**Tabelle 4.2** Stereologische Parameter intestinaler Mikrovilli. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ( $SD$ ) sind angegeben. n steht für die Anzahl der Querschnitte bzw. quantifizierten Mikrovilli.

Ausgehend von der, für den gesamten Dünndarm berechneten Anzahl der Mikrovilli von  $1,3 \times 10^{12}$  ( $SD \pm 1,0 \times 10^{11}$ ), deren mittlerer Oberfläche sowie der miteinbezogenen Fläche zwischen den Mikrovilli konnte die Oberfläche der gesamten resorbierenden Dünndarmschleimhaut ermittelt werden. Mit durchschnittlich  $4581 \text{ cm}^2$  ( $SD \pm 371 \text{ cm}^2$ ) vergrößern

die Mikrovilli die, durch die Zotten bereits makroskopisch erweiterte Dünndarmoberfläche nochmals um das 22,6-fache ( $SD \pm 0,1$ ). Der Gesamtzuwachs der tatsächlichen Resorptionsfläche im Dünndarm steigt durch das Vorhandensein von Zotten und den Mikrovilli-besatz der Enterozyten insgesamt um das 150,3-fache ( $SD \pm 14,2$ ).

#### **4.2 Zwei-Photonen-Mikroskopie der Dünndarmschleimhaut *in vivo***

Mit der konventionellen Licht- und Elektronenmikroskopie konnte die dreidimensionale Architektur der inneren Oberfläche des murinen Dünndarms in statischer Situation beschrieben und quantitativ analysiert werden. Durch die verschiedenen strukturellen Spezialisierungen vergrößert sich die Dünndarmschleimhaut der Maus im Vergleich zu einer glatten, Zotten- und Mikrovilli-freien Oberfläche auf etwa  $0,46 \text{ m}^2$  und stellt somit nicht nur eine enorme Oberfläche für die Verdauung und Resorption von Nährstoffen dar, sondern auch eine riesige Angriffsfläche für eine Vielzahl von exogenen, über die Nahrung aufgenommenen Mikroorganismen, Pathogenen und Antigenen. Neben einer effizienten Resorption besteht die wesentliche Aufgabe der Schleimhaut daher auch im Schutz der inneren, das Dünndarmlumen auskleidenden Epithelschicht.

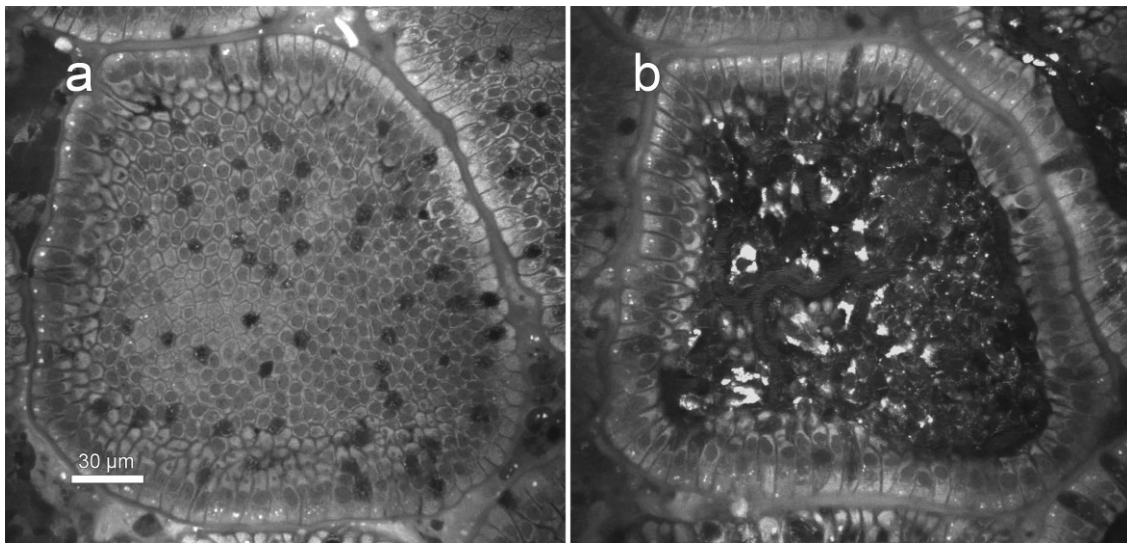
Mithilfe der intravitalen Zwei-Photonen-Mikroskopie gelang es, das einschichtige Epithel der Dünndarmzotten unter physiologischen Bedingungen hochaufgelöst *in vivo* abzubilden. Neben der Verteilung verschiedener Zelltypen innerhalb des Epithels stand dabei vor allem die Dynamik der intraepithelialen Lymphozyten im Vordergrund. So konnte das Migrationsverhalten der Lymphozyten im Zottenepithel visualisiert, die Geschwindigkeiten und zurückgelegten Entfernungen über längere Zeiträume hinweg ermittelt sowie die Dauer von Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakten und Interaktionen mit der Lamina propria quantifiziert werden. Die spezifische Markierung der Zellmembran intraepithelialer Lymphozyten ermöglichte dabei die simultane Charakterisierung der Autofluoreszenz-basierten Signale mit denen Farbstoff-induzierter Aufnahmen und somit zusätzliche Informationen zur Beschreibung der Dynamik intraepithelialer Lymphozyten.

##### **4.2.1 Morphologie und Morphometrie des Zottenepithels *in vivo***

Bedingt durch die Laser-induzierte Anregung endogener Fluorophore konnte die dreidimensionale Morphologie des vitalen Dünndarmepithels ohne Applikation exogener Farbstoffe untersucht, die verschiedenen Zelltypen anhand ihres Aussehens unterschieden und

dynamische Prozesse innerhalb des intakten Epithelverbands lebender, anästhesierter Mäuse über mehrere Stunden hinweg visualisiert werden.

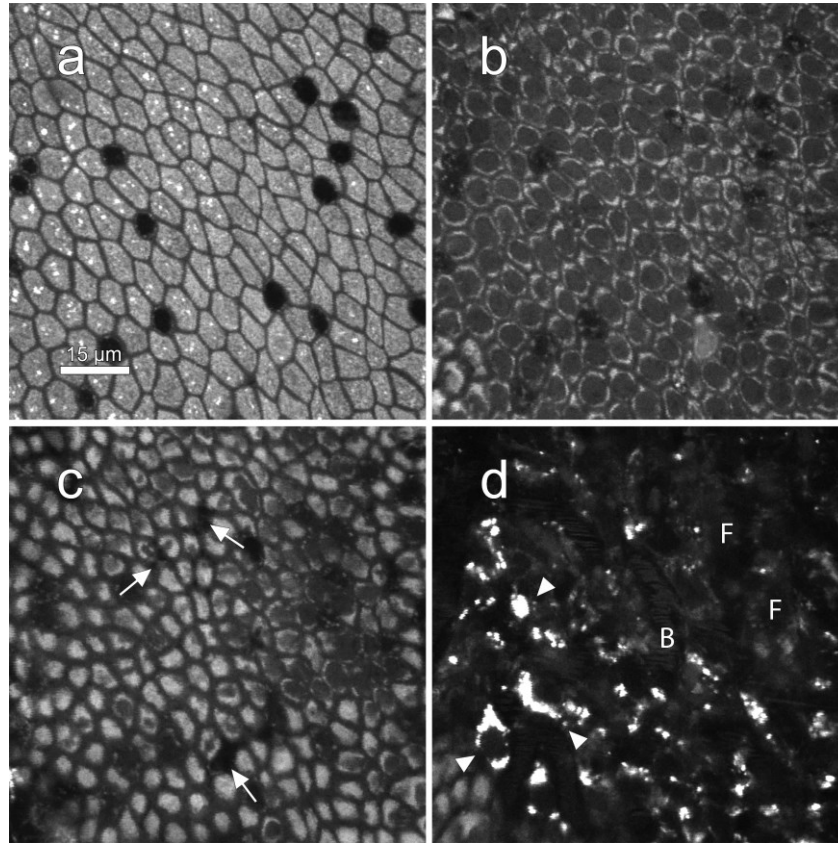
Das, die intestinalen Zotten kontinuierlich bedeckende, einschichtige Epithel enthält mehrere verschiedene Zelltypen, welche die innere Auskleidung des Dünndarms darstellen und sich durch die Basalmembran vom darunter liegenden Schleimhautbindegewebe abgrenzen (Abbildung 4.4). Durch die Anlagerung von Teilen der Zottenoberfläche an das Deckglas (siehe S. 31) erscheint der epitheliale Zellverband intravital weitgehend eben und homogen.



**Abbildung 4.4** Autofluoreszenz-basierte Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie. Übersichtsaufnahme einer Dünndarmzotte in zwei unterschiedlichen Gewebetiefen. Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 710 \text{ nm}$ , Bildfeld  $310 \mu\text{m} \times 310 \mu\text{m}$ . **(a)** Optischer Schnitt durch das Zottenepithel etwa  $15 \mu\text{m}$  unterhalb der luminalen Oberfläche. Die Zottenoberfläche liegt unmittelbar dem Deckglas an, sodass der Epithelverband eben und homogen erscheint. Das aufgezeichnete Autofluoreszenz-Signal beruht hauptsächlich auf der reduzierten Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphats (NAD(P)H), welches in den Mitochondrien der Enterozyten, vorwiegend in der Zellspitze wie auch versammelt im basalen Zytoplasma, vorkommt. **(b)** Schnitt durch das Zottenstroma in rund  $35 \mu\text{m}$  Tiefe. Die Anregung lysosomaler Flavine sowie Lipopigmente innerhalb APC (ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2011) erzeugt eine fokal besonders hell leuchtende Autofluoreszenz.

Mithilfe des beschriebenen experimentellen Setups wurden optische Serienschritte in verschiedenen Gewebetiefen aufgezeichnet, daraus 3D-Bildstapel generiert und so die komplexe, dreidimensionale Morphologie der murinen Schleimhaut im Dünndarm mit subzellulärer Auflösung *in vivo* visualisiert (Abbildung 4.5 und Movie 4.5). Vom Lumen beginnend wurde das physiologisch intakte Epithel einer Zotte mit darunter liegender Lamina

propria durch optische Serienschritte in 0,5  $\mu\text{m}$ -Schritten detailliert dargestellt, wodurch strukturelle Charakteristika und selbst einzelne Zellorganellen wie Zellkerne und Lysosomen mit hoher Auflösung und hohem Kontrast unterschieden werden können.



**Abbildung 4.5. Movie 4.5** Ausgewählte optische Schnitte aus einem Bildstapel durch das lebende, intestinale Zottenepithel. Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 710 \text{ nm}$ , Bildausschnitt  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ . **(a)** Optischer Schnitt durch das apikale Zytoplasma in  $3 \mu\text{m}$  Tiefe. Das pflastersteinartige Mosaikmuster der Enterozyten mit vereinzelt eingestreuten, dunkel erscheinenden Becherzellen ist erkennbar. Die Lysosomen der Enterozyten zeigen eine besonders starke Autofluoreszenz. **(b)** In  $15 \mu\text{m}$  Tiefe erscheinen die angeschnittenen Zellkerne der Enterozyten als dunkle, rundliche Strukturen mit zentraler Lage im Zytoplasma. **(c)** Optischer Schnitt durch das basale Zytoplasma in  $22 \mu\text{m}$  Tiefe. Die Zellkerne sind teilweise noch angeschnitten. Schwarz erscheinende intraepitheliale Lymphozyten zwischen den basalen Zellgrenzen der Epithelzellen liegen hier im Epithel (Pfeile). **(d)** In  $32 \mu\text{m}$  Tiefe erscheint die Lamina propria als lockeres Bindegewebe mit zahlreichen Zellen. Antigen-präsentierende Zellen mit ihren hell erscheinenden, lysosomalen Granula (Dreiecke), Fibroblasten (F) und Blutkapillaren (B) sind zu erkennen. Die artifiziellen Streifenmuster innerhalb der Kapillaren belegen einen intakten Blutstrom (siehe Movie 4.5).

Knapp unterhalb des apikalen, kaum fluoreszierenden Bürstensaums erscheint das Epithel als pflastersteinartiges Mosaik mit hellen Flächen und dunklen Grenzen (Abbildung 4.5 a). Im Gegensatz zum hell leuchtenden Zytoplasma der Enterozyten erscheinen die Zell-

grenzen als Mitochondrien-freie Schicht des Zytoskeletts unterhalb der lateralen Zellmembran signalarm und daher dunkel. Der Querschnitt der Enterozyten erscheint polygonal. Die vereinzelt eingestreuten, eher rund-ovalen, dunklen Aussparungen innerhalb des hellen Enterozytenverbands stellen Becherzellen mit ihren Schleimgranula dar. Der Mukus der Becherzellen selbst fluoresziert nicht, die Organellen im Zytoplasma unterhalb der Schleimgranula (KENDALL ET AL., 1991) können dagegen zur Autofluoreszenz angeregt und dadurch sichtbar gemacht werden (Abbildung 4.5 b und c).

Die selten vorkommenden, enteroendokrinen Zellen konnten anhand ihrer typisch schmalen und langgestreckten Form sowie den basalen Hormongranula identifiziert und so von Becherzellen unterschieden werden. Bürstenzellen als ebenfalls seltener Zelltyp des Darmepithels konnten mithilfe der Autofluoreszenz-basierten Zwei-Photonen-Mikroskopie dagegen nicht eindeutig identifiziert werden.

Einige Enterozyten zeigen besonders hell leuchtende Granula im apikalen Zytoplasma (Abbildung 4.5 a). Übereinstimmend mit den TEM-Aufnahmen (Abbildung 4.6) können diese als Lysosomen identifiziert werden, welche hauptsächlich im apikalen Zytoplasma der Enterozyten, rund 4  $\mu\text{m}$  oberhalb der Zellkerne, lokalisiert sind (ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2011). Die längsovalen Zellkerne der Enterozyten befinden sich in der unteren Hälfte der Zellen. Sie werden ungefähr 7  $\mu\text{m}$  unterhalb der Epithelzelloberfläche angeschnitten und erstrecken sich über etwa 12  $\mu\text{m}$  in die Tiefe (Abbildung 4.5 b und c). Infolge der geringen Konzentrationen von fluoreszierendem NADH zeigen diese keine bis wenig Autofluoreszenz (ZHANG ET AL., 2002).

Der schmale und einheitliche Zellspalt zwischen den Epithelzellen ist unterhalb der Zellkernebene, in einer Tiefe von etwa 25  $\mu\text{m}$ , stellenweise stark erweitert (Abbildung 4.5 c). Diese unregelmäßigen Lücken im Epithelverband werden durch wenig fluoreszierende Zellen hervorgerufen, welche einen, ihr Volumen größtenteils ausfüllenden, nicht-fluoreszierenden Zellkern sowie ein schwach autofluoreszierendes Organellenpaket besitzen und als intraepitheliale Lymphozyten identifiziert werden können. Mit 50–60% bei der Maus vorwiegend  $\gamma\delta^+$  TCR-exprimierende T-Zellen (CHENNUPATI ET AL., 2010), sind diese spezialisierten Lymphozyten auf das basale Drittel des Epithels begrenzt.

Das einschichtige Epithel wird durch die Basalmembran von der darunter liegenden Lamina propria abgegrenzt. Über Adhäsionsmoleküle an ihren basalen Zellpolen fixiert, sitzen die Enterozyten dieser 50–100 nm dünnen Kollagenschicht auf. Geht ihre Adhäsionsfähigkeit zur Basalmembran verloren, unterliegen die Enterozyten dem programmierten



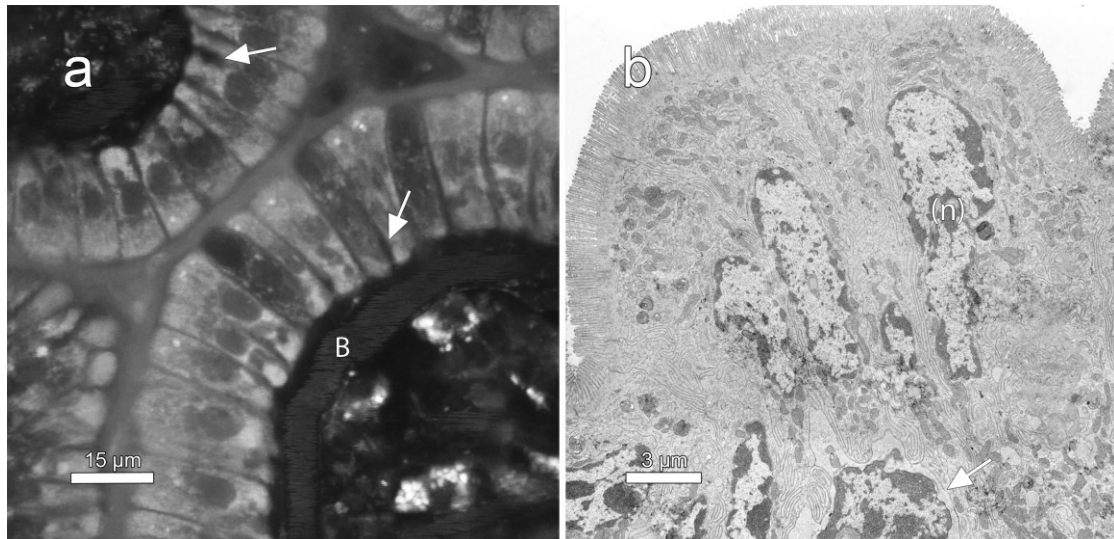
Zelltod und werden ins Lumen abgeschilfert (HALL ET AL., 1994; HOFMANN ET AL., 2007). Die Basalmembran besteht hauptsächlich aus nicht-fibrillärem Kollagen vom Typ IV, welches nicht autofluoresziert sowie kaum *SHG*-Signale (siehe S. 27) liefert, und daher mithilfe der Autofluoreszenz-basierten Zwei-Photonen-Mikroskopie nicht direkt sichtbar gemacht werden kann (LE BLEU ET AL., 2007; STRUPLER ET AL., 2007).

Innerhalb des lockeren Bindegewebes der Lamina propria, in rund 30 µm Tiefe, können Antigen-präsentierende Zellen, flache, sternförmige Fibroblasten, Lymphozyten sowie Blutkapillaren identifiziert werden (Abbildung 4.5 d). Die Gefäßwände des dicht unterhalb der Basalmembran verlaufenden Kapillarnetzes waren ohne den Effekt der *second harmonic generation (SHG)* nicht darstellbar. Jedoch emittieren die darin zirkulierenden Erythrozyten ein schwaches Autofluoreszenz-Signal und erscheinen während einer schnellen, zeilenweisen Abtastung daher als zufällige Streifenmuster parallel zur Scanrichtung. Diese Bewegungsartefakte dienen der zusätzlichen, unmittelbaren Sicherstellung einer konstant vorliegenden, physiologischen Gewebsdurchblutung und waren bei aussetzender Mikrozirkulation nicht zu sehen. Obwohl das Zottenstroma auch initiale Lymphgefäße enthält (ABBAS ET AL., 1989; CHOE ET AL., 2015), konnten diese nicht sicher identifiziert werden.

Fibroblasten zählen zu den fixen Zellen des Schleimhautbindegewebes, spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese von Kollagen und anderen Bestandteilen der Interzellularsubstanz, und sorgen so für eine erhöhte Stabilität subepithelialer Kapillaren sowie der extrazellulären Matrix (MARSH UND TRIER, 1974; KOMURO UND HASHIMOTO, 1990). Ihr runder bis ovaler Zellkern sowie die irregulär geformten, zytoplasmatischen Fortsätze sind vom umliegenden Gewebe nur schwer abzugrenzen. Im Gegensatz zu den stationären Bindegewebszellen migrieren Lamina propria-Lymphozyten (LPL) durch das Zottenstroma (KLINGER ET AL., 2012). Obwohl diese beweglichen, vorwiegend CD4<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> exprimierenden T-Zellen einen individuellen Phänotyp und charakteristische funktionelle Merkmale besitzen (ZEITZ ET AL., 1991; RESÉNDIZ-ALBOR ET AL., 2005), können sie morphologisch nicht von den intraepithelialen Lymphozyten unterschieden werden.

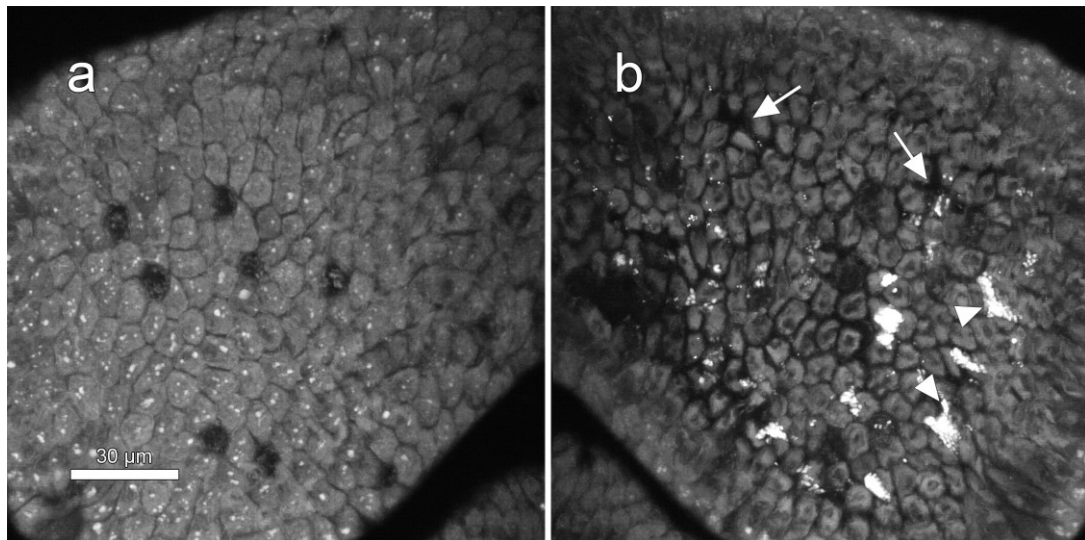
Aufgrund ihrer zahlreich vorhandenen, lysosomalen Granula erscheinen Antigen-präsentierende Zellen wie DC oder Makrophagen bei Zwei-Photonen-Anregung leuchtend hell (Abbildung 4.5 d). Dieses starke Autofluoreszenz-Signal basiert jedoch nicht auf mitochondrialem NAD(P)H, sondern auf dem Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) der Lysosomen (SHIN UND MEGO, 1988; ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2011).

Der Vergleich intravital aufgezeichneter, Autofluoreszenz-basierter Bilder mit elektronenmikroskopischen Ultradünnschnitten zeigt eine deutliche Übereinstimmung in der Strukturdarstellung des Zottenepithels (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6** Gegenüberstellung von Zwei-Photonen- und Transmissionselektronenmikroskopie in orthogonalen, senkrecht zur Epitheloberfläche orientierten Schnitten durch das Zottenepithel. **(a)** Bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 710 \text{ nm}$  erscheinen Mitochondrien, Zytoplasma und Lysosomen hell, andere Zellorganellen wie Zellkerne, Mikrovilli sowie die Granula der Becherzellen dagegen dunkel. Die IEL zeigen sich als dunkle Lücken im basalen Drittel des Epithels (Pfeile). Blutkapillaren (B) verlaufen als dichtes Kapillarnetz unmittelbar unterhalb des Epithels. **(b)** Elektronenmikroskopische Morphologie des Zottenepithels. Der längsovale, größtenteils elektronenlichte Zellkern der Enterozyten (n) erstreckt sich über die untere Hälfte der Zelle. Im kontrastarmen Zytoplasma lassen sich zahlreiche elektronendichtere Mitochondrien und Lysosomen erkennen, wobei letztere vor allem auf das supranukleäre Zellkompartiment begrenzt sind. Im *terminal web* kurz unterhalb der apikalen Zelloberfläche finden sich keine Zellorganellen. Die zum Darmlumen hin gerichtete Zelloberfläche der Enterozyten ist durch zahlreiche Mikrovilli stark vergrößert, welche parallel angeordnet und lediglich elektronenmikroskopisch auflösbar sind. Benachbarte Enterozyten bilden laterale Interdigitationen aus, welche stellenweise durch IEL erweitert sind. Die IEL zeigen einen, ihr Volumen größtenteils ausfüllenden Zellkern sowie ein organellenarmes Zytoplasma (Pfeil).

Die Aufzeichnung mehrerer Fokusebenen entlang der optischen Achse ermöglicht neben der Wiedergabe einzelner optischer Schnitte in verschiedenen Gewebetiefen auch eine 3D-Darstellung des intravitalen Zottenepithels mit angeschnittener Lamina propria bei hoher Auflösung (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.7** 3D-Ansicht eines 12  $\mu\text{m}$  dicken Bildstapels der lebenden Dünndarmschleimhaut. Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 755 \text{ nm}$ , Bildausschnitt 152  $\mu\text{m} \times 152 \mu\text{m}$ , räumliche Auflösung in  $z$  von 1  $\mu\text{m}$ . **(a)** Sicht auf die luminal Epithelzelloberfläche mit Blick vom Darmlumen aus. Das Zottenepithel erscheint als pflastersteinartiges Mosaik mit hellen Zytoplasmaflächen und dunklen Zellgrenzen. Enterozyten erscheinen aufgrund des Autofluoreszenz-Signals des mitochondrialen NAD(P)H hell und sind dadurch von den vereinzelt eingestreuten, dunkler erscheinenden Becherzellen zu unterscheiden. Die Lysosomen im apikalen Zytoplasma der Enterozyten zeigen ein besonders starkes Autofluoreszenz-Signal. **(b)** Sicht von der Gegenseite auf das basale Epithel. Neben dem basalen Zytoplasma der Enterozyten erscheinen besonders die APC innerhalb des Schleimhautbindegewebes leuchtend hell (Dreiecke). Die IEL sind als Lücken im Epithel zu erkennen (Pfeile).

#### 4.2.2 Quantifizierung von Enterozyten, Becherzellen und IEL

Obwohl das einschichtige Zottenepithel mindestens fünf verschiedenen spezialisierte Zelltypen enthält, stellen Enterozyten und Becherzellen bei weitem den Hauptanteil der Epithelzellen im Dünndarm dar. Genaue quantitative Angaben über die Zusammensetzung des Zottenepithels in der Maus liegen bislang jedoch nicht vor.

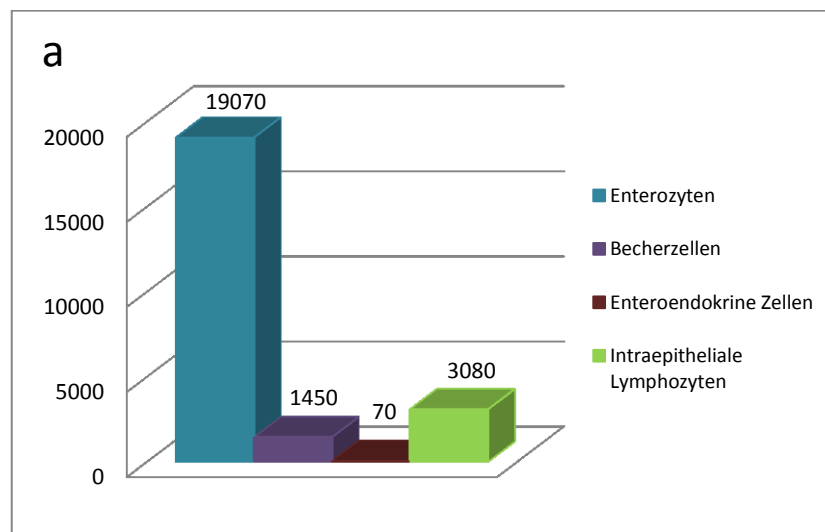
Um die Anzahl der, im Epithel einer Zotte befindlichen Enterozyten, Becherzellen sowie IEL zu ermitteln, und somit das numerische Verhältnis der Zelltypen zueinander zu bestimmen, wurde im Anschluss an die Beschreibung des intakten Zottenepithels die Zelldichte innerhalb definierter Bildfelder *in vivo* bestimmt. Die resultierende quantitative Analyse dreidimensionaler Bildstapel ergab eine durchschnittliche Gesamtzellzahl von 23.660 ( $SD \pm 2460$ ) pro  $\text{mm}^2$  Zottenoberfläche. Mit 19.070 ( $SD \pm 1980$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  stellen die Enterozyten den vorherrschenden Zelltyp im Epithel von Dünndarmzotten dar.

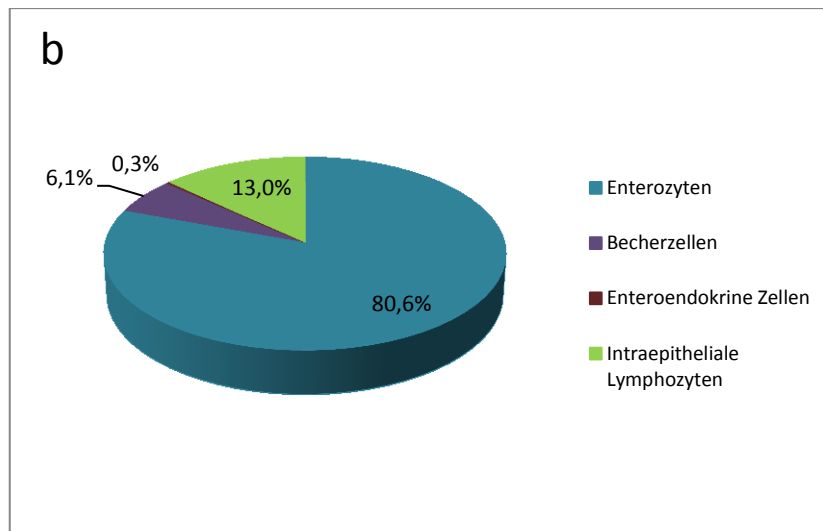
Deutlich seltener finden sich Becherzellen. Zwar variiert die Anzahl dieser schleimbildenden Epithelzellen innerhalb einzelner Bildausschnitte, ein in der Literatur (TRIER UND MADARA, 1981; NEUTRA, 1988) beschriebenes, signifikant erhöhtes Vorkommen der Becherzellen im Epithel aboral gelegener Zotten konnte jedoch nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Mit durchschnittlich 1450 ( $SD \pm 360$ ) Becherzellen pro  $\text{mm}^2$  kommen etwa 13,9 ( $SD \pm 3,6$ ) Enterozyten auf eine Becherzelle.

In der basalen Hälfte des Epithels finden sich intraepitheliale Lymphozyten knapp oberhalb der Basalmembran. Mit einer mittleren Häufigkeit von 3080 ( $SD \pm 880$ ) Lymphozyten pro  $\text{mm}^2$  kommt ein IEL auf etwa 7,2 ( $SD \pm 1,4$ ) intestinale Epithelzellen.

Die stark granulierten, enteroendokrinen Zellen konnten lediglich in einigen wenigen Aufzeichnungen identifiziert werden – wenn, dann jedoch oft in kleineren Gruppen von zwei bis vier Zellen. Anhand der ermittelten Häufigkeit ihres Vorkommens ergibt sich ein prozentualer Anteil von rund 0,3% ( $SD \pm 0,5$ ) an der Gesamtzellzahl des Zottenepithels.

Die Abbildung 4.8 zeigt die Anzahl der verschiedenen Epithelzelltypen und im Epithel befindlichen intraepithelialen Lymphozyten pro definiertem Bildfeld sowie die sich daraus ergebende prozentuale Verteilung im Zottenepithel.





**Abbildung 4.8** Quantitative Angaben über die Zusammensetzung des intestinalen Zottenepithels. **(a)** Anzahl der Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrinen Zellen und IEL innerhalb eines definierten Meßfelds von 1 mm<sup>2</sup> sowie **(b)** die daraus resultierende, prozentuale Verteilung der Zelltypen im Zottenepithel. In die quantitative Analyse wurden insgesamt 55 intestinale Zotten unterschiedlicher Regionen einbezogen (n=12 Mäuse). Die Mittelwerte sind angegeben.

Bezugnehmend auf die in Kapitel 4.1.2.1 beschriebene, mathematische Annäherung an die mittlere Zottenoberfläche *ex vivo* konnten die intravital quantifizierten Epithelzellzahlen einzelner Bildausschnitte auf die Oberfläche einzelner Zotten bezogen und letztlich auf den gesamten Dünndarm hochgerechnet werden.

Mit durchschnittlich 3210 Epithelzellen sowie 480 IEL umfasst das intestinale Epithel einer Zotte im Mittel 3690 Zellen. In Abhängigkeit der, sich entlang des oral-aboralen Verlaufs des Dünndarms voneinander unterscheidenden Zottenoberflächen variiert auch die Anzahl der Zellen des Zottenepithels innerhalb verschiedener Dünndarmabschnitte. Während sich die Zellzahl im Epithel oral (duodeno-jejunal) gelegener Zotten mit rund 6510 Zellen/Zotte beinahe verdoppelt, kommen im Epithel ilealer Zotten lediglich rund 1510 Zellen/Zotte vor. Aussagen über eine variierende Verteilung einzelner Epithelzelltypen innerhalb der verschiedenen Dünndarmabschnitte konnten dabei nicht mit ausreichender Sicherheit getroffen werden. Bezogen auf die ermittelte Schleimhautoberfläche des Dünndarms sowie die mittlere, intravital quantifizierte Zelldichte pro mm<sup>2</sup> umfasst das intestinale Epithel der Maus eine berechnete Gesamtzellzahl von rund 479.560.000 Zellen (n=54). Enterozyten machen dabei allein etwa 386.700.000 Zellen aus. Becherzellen finden sich, vereinzelt eingestreut, mit rund 29.414.000 Zellen im Zottenepithel des murinen Dünndarms. Die Gesamtzellzahl der intraepithelialen Lymphozyten beläuft sich auf etwa

62.510.000 Zellen, was einem prozentualen Anteil von 13,0% an allen Zellen des intestinalen Zottenepithels entspricht.

### 4.3 Dynamik intraepithelialer Lymphozyten

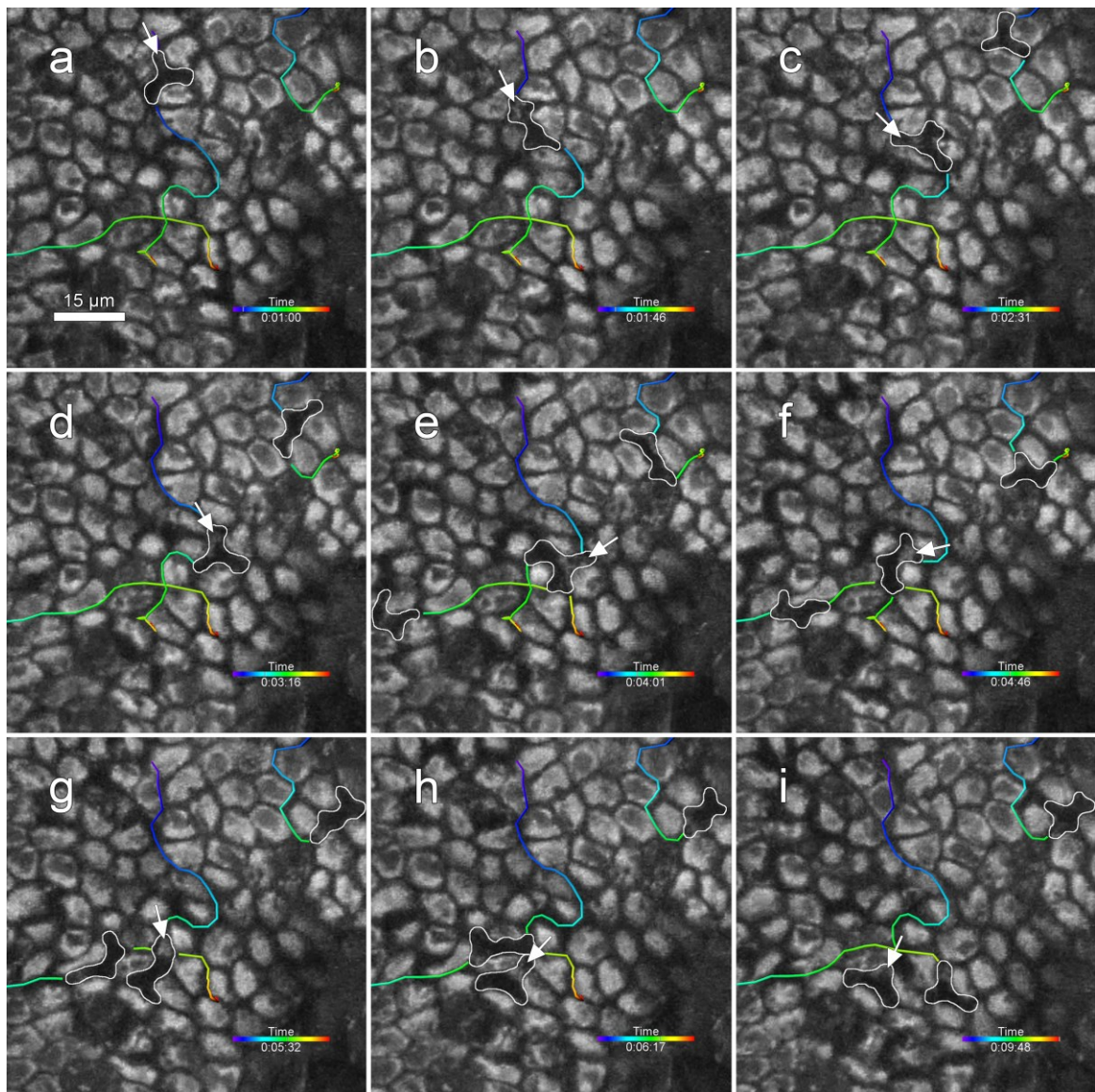
Die Zwei-Photonen-Mikroskopie erlaubt eine *in vivo* Identifizierung und Quantifizierung individueller Zelltypen in intestinalen Zotten. Zusätzlich zur dreidimensionalen Bildgebung des intestinalen Zottenepithels zu einem einzigen Zeitpunkt ermöglicht das wiederholte Scannen einzelner 3D-Bildstapel ein und desselben Gewebevolumens die Aufzeichnung von zeitlichen Veränderungen in Gewebeschichten über einen längeren Zeitraum hinweg und somit eine funktionelle, vierdimensionale Bildgebung (x, y, z sowie Zeit t) unter experimentellen *in vivo* Bedingungen.

Im Anschluss an die *in vivo* Morphometrie des intakten Dünndarmepithels der Maus wurde daher untersucht, ob und wie sich die Dynamik der intraepithelialen Lymphozyten innerhalb des intestinalen Epithelverbands mithilfe der intravitalen Zwei-Photonen-Mikroskopie darstellen, verfolgen und quantifizieren lässt. Hierzu wurde das Migrationsverhalten individueller IEL zunächst rein Autofluoreszenz-basiert, ohne exogene Fluoreszenzfarbstoffe, visualisiert. Durch die anschließende Markierung der Zellmembranen mit einem Zelltyp-spezifischen Antikörper konnten weitere Einblicke in die zeitlich aufgelösten, dynamischen Prozesse der IEL erlangt, Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte analysiert und Interaktionen mit der angrenzenden Lamina propria aufgeklärt werden.

#### 4.3.1 Dynamik unmarkierter Lymphozyten

Das Dünndarmepithel der Maus enthält rund  $62,5 \times 10^6$  Lymphozyten (siehe S. 54). Durch die Verwendung der hochauflösenden, Autofluoreszenz-basierten Zwei-Photonen-Mikroskopie konnten je nach Bildfeldgröße bis zu 30 IEL gleichzeitig im intestinalen Zottenepithel visualisiert und über die Zeit verfolgt werden. Das aufgezeichnete Autofluoreszenz-Signal beruht, wie bereits beschrieben, dabei hauptsächlich auf der reduzierten Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphats (NAD(P)H), welches vor allem in den Mitochondrien, vorwiegend in der Zellspitze wie auch versammelt im basalen Zytoplasma resorbierender Epithelzellen, vorkommt (KENDALL ET AL., 1991; KÖNIG, 2000). Da intraepitheliale Lymphozyten lediglich eine geringe Anzahl von Mitochondrien sowie einen, ihr Volumen größtenteils ausfüllenden, nicht-fluoreszierenden Zellkern enthalten, erscheinen sie im Gegensatz zu den heller leuchtenden Enterozyten dunkel.

Um die Dynamik einzelner unmarkierter IEL innerhalb des dreidimensionalen Epithelverbands der murinen Dünndarmschleimhaut über einen längeren Zeitraum hinweg quantifizieren zu können, wurden wiederholt (alle 15–30 sec) optische Serienschritte in verschiedenen Gewebetiefen aufgezeichnet und daraus 3D-Zeitserien in Form von vierdimensionale Datensätzen generiert. Apikal behält der epitheliale Zellverband dabei sein charakteristisches Muster über Minuten und Stunden der Aufzeichnungen bei. Erst im basalen Epithel der Zotten ist die Dynamik der intraepithelialen Lymphozyten zu erkennen (Abbildung 4.9 und Movie 4.9).



**Abbildung 4.9. Movie 4.9** Dynamik intraepithelialer Lymphozyten im intakten Zottenepithel. Ausgewählte optische Schnitte einer 3D-Zeitserie in einer Tiefe von etwa 25  $\mu\text{m}$ , über eine Dauer von 9 min 48 sec. Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 710 \text{ nm}$ , Bildausschnitt 76  $\mu\text{m} \times 76 \mu\text{m}$ , zeitliche Auflösung 15 sec. Die Lamina

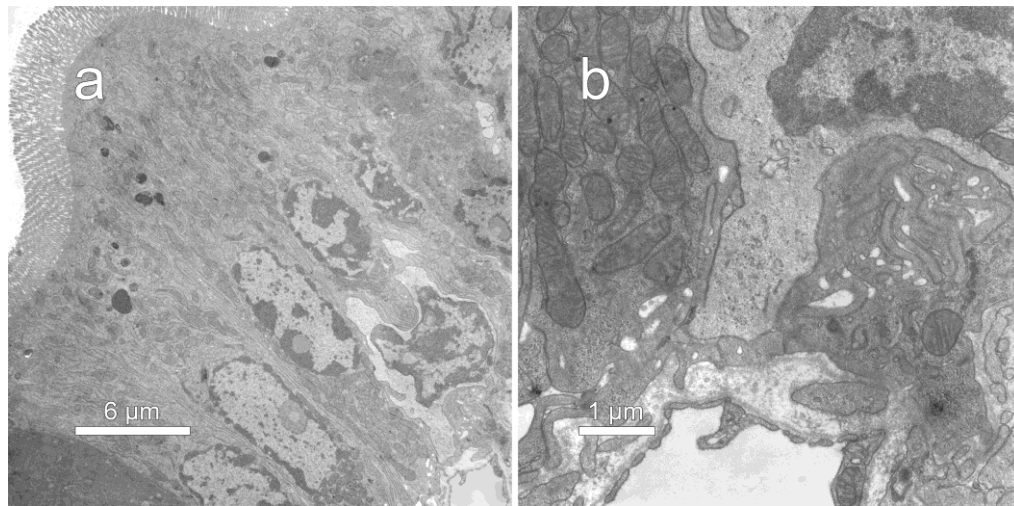


propria ist teilweise angeschnitten. Zur besseren Veranschaulichung sind die Migrationswege von drei ausgewählten, dunkel erscheinenden IEL schematisch dargestellt und deren Zellumrisse manuell umzeichnet. Der Verlauf der Zeitachse ist farbkodiert (**a-i**). In der basalen Hälfte des Epithels patrouillieren die dunkel erscheinenden IEL durch die Interzellularräume. Anhand ihres gering autofluoreszierenden Organellenpakets im hinteren Zellpol kann die Bewegungsrichtung der im Epithel migrierenden, polarisierten IEL selbst in einzelnen Bildstapeln bestimmt werden (Pfeil).

Die kaum fluoreszierenden, intraepithelialen Lymphozyten bewegen sich als scheinbare Lücken im epithelialen Interzellularraum der Zotten stetig fort. Während ihrer Wanderung auf die basale Hälfte des Epithels begrenzt, patrouillieren die Lymphozyten durch den hell erscheinenden Epithelverband, drängen sich dabei sanduhrartig zwischen benachbarten Epithelzellen hindurch und ragen mit ihren zellulären Ausstülpungen und länglichen Fortsätzen fortlaufend in umliegende Zellzwischenräume. Erst durch das Auseinanderdrängen angrenzender, hell fluoreszierender Enterozyten, durch die basale Erweiterung des schmalen, dunkel erscheinenden Zellspalts und die sich anschließende Wiederannäherung der Epithelzellgrenzen wird die amöboide Gestalt und das kriechende Bewegungsmuster der IEL oberhalb der Basalmembran erkennbar.

Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen von Gewebeschnitten zeigen, dass die Lymphozyten dabei bestehende Interdigitationen zwischen Epithelzellen öffnen und ohne Spaltbildung in direktem Kontakt zu den benachbarten, basolateralen Epithelzellmembranen liegen (Abbildung 4.10). Während die Interdigitationen an einem Ende der IEL verschlossen sind, erscheinen sie am anderen, gegenüber liegenden Ende der Lymphozyten teilweise geöffnet und weniger ineinander verzahnt. Aufgrund der *in vivo* beschriebenen Lage des Organellenpakets kann letzterem der hintere Zellpol der IEL und somit auch in elektronenmikroskopischen Aufzeichnungen die Bewegungsrichtung zugeordnet werden. Trotz des Auseinanderdrängens basolateraler Zellgrenzen bleiben im Regelfall zytoplasmatische Fortsätze benachbarter Enterozyten kurz oberhalb der Basalmembran miteinander in Verbindung. Ein direkter Kontakt der, zwischen benachbarten Epithelzellen lokalisierten intraepithelialen Lymphozyten zur Basalmembran konnte in keiner der TEM-Aufnahmen beobachtet werden (n=52 intraepitheliale Lymphozyten).





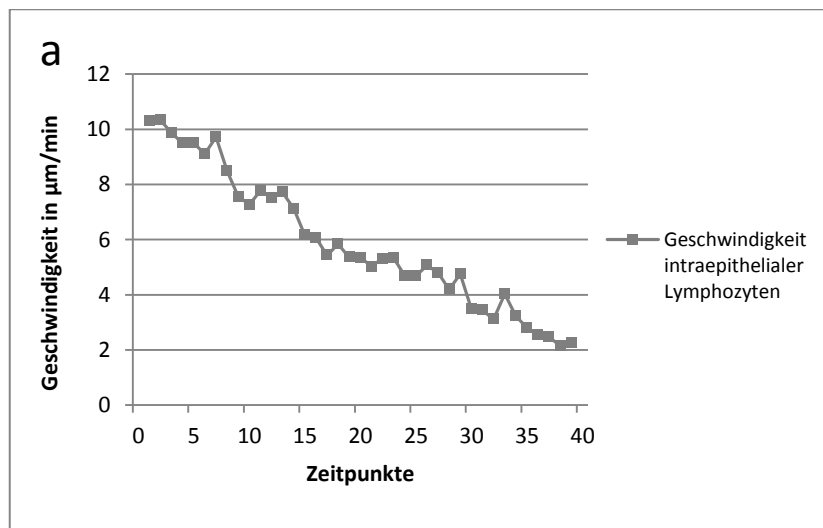
**Abbildung 4.10** Lokalisation der IEL im epithelialen Zellzwischenraum. Elektronenmikroskopisch sind bestehende Interdigitationen und Zellgrenzen deutlich zu erkennen. **(a)** Die im basalen Epithelverband liegenden IEL drängen die spezialisierten Zell-Zell-Verbindungen benachbarter Enterozyten ohne Spaltbildung auseinander. Die apikal lokalisierten *tight junctions* bleiben jedoch kontinuierlich miteinander verschlossen. Stellenweise Ausbuchtungen der Zell- und Zellkernmembran intraepithelialer Lymphozyten deuten auf einen dynamischen Vorgang hin. **(b)** Zytoplasmatische Fortsätze benachbarter Enterozyten trennen Lymphozyt und Basalmembran.

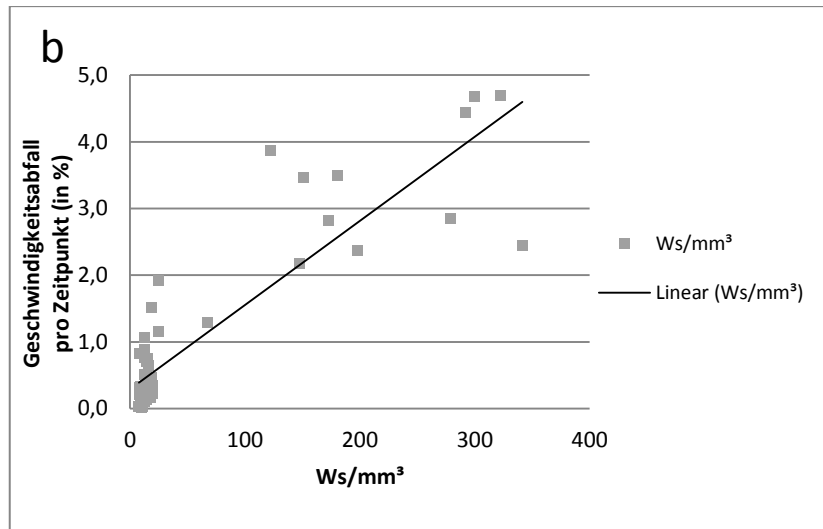
Die intraepithelialen Lymphozyten bewegen sich *in vivo* vorzugsweise parallel zur angrenzenden Basalmembran. Ihre amöbenähnliche Migration ist dabei durch das rhythmisch wiederkehrende Vorwölben des vorderen Zellpols und das anschließende Nachziehen des hinteren charakterisiert und wurde, verteilt im basalen Epithel intestinaler Zotten, über eine Versuchsdauer von bis zu 8 Stunden hinweg beobachtet. Selten konnten auch oberhalb der Zellkernebene der Enterozyten kurzzeitig (bis zu 1 min 53 sec) einzelne Ausstülpungen und Fortsätze der IEL im Interzellularraum des Epithels identifiziert werden. Ins Darm-lumen ragende Fortsätze oder gar Durchtritte aus dem Zottenepithel ins Lumen wurden in 211 3D-Zeitserien jedoch nicht ein einziges Mal beobachtet (n=41 Mäuse, n=10.556 intra-epitheliale Lymphozyten).

Um das Migrationsverhalten zu analysieren und zu quantifizieren, wurden die IEL mithilfe der Bildbearbeitungssoftware Imaris im epithelialen Zellverband über mehrere Zeitpunkte hinweg manuell markiert und deren Bewegungsmuster anhand verschiedener Parameter beurteilt. Durch die Bestimmung der Raumkoordinaten ihres Zellmittelpunktes zu jedem einzelnen Zeitpunkt konnte u.a. die Migrationsgeschwindigkeit, zurückgelegte Entfernung, die Entfernungsrates sowie der Abweichungsindex ermittelt und anschließend verglichen werden.

#### 4.3.1.1 Laser-induzierte, phototoxische Wirkung

Bei hohen Bestrahlungsintensitäten bleiben die im Bildfeld befindlichen IEL jedoch bereits wenige Minuten nach Beginn der Aufzeichnungen stehen (Abbildung 4.9 g-i und Movie 4.9). Ein Vergleich der Anfangs- und Endgeschwindigkeiten innerhalb hochauflöser 3D-Zeitserien mit deutlich erhöhter Gewebsbelastung zeigt eine nahezu kontinuierliche Abnahme ihrer mittleren Geschwindigkeit über die Zeit (Abbildung 4.11 a). So verlangsamt sich die Migration intraepithelialer Lymphozyten durch das intakte Zottenepithel bei einer Bestrahlungsintensität von  $212 \text{ Ws/mm}^3$  ( $SD \pm 91 \text{ Ws/mm}^3$ ) innerhalb der ersten 40 Zeitpunkte um durchschnittlich 78,5% ( $n=168$  intraepitheliale Lymphozyten). Anhand vergleichender Analysen von 4D-Datensätzen mit unterschiedlichen Lasereinstellungen und Pixelverweilzeiten konnte das Verhältnis der Bestrahlungsintensität zum Abfall der Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten über die Zeit bestimmt werden. Dabei zeigt sich ein deutlich korrelierender Zusammenhang. Je höher die Bestrahlungsdichte des Gewebes ( $\text{Ws/mm}^3$ ), desto stärker ist auch der Abfall der mittleren Geschwindigkeit bestrahlter IEL pro aufgezeichnetem Zeitpunkt (Abbildung 4.11 b). Während IEL bei gemittelten Bestrahlungsintensitäten von rund  $14 \text{ Ws/mm}^3$  ( $SD \pm 4 \text{ Ws/mm}^3$ ) mit jedem weiteren Scan durchschnittlich 0,4% ( $SD \pm 0,004\%$ ) langsamer werden ( $n=48$ ), fällt die mittlere Geschwindigkeit bei  $212 \text{ Ws/mm}^3$  ( $SD \pm 91 \text{ Ws/mm}^3$ ) im Mittel um 3,6% ( $SD \pm 1,6\%$ ) pro Zeitpunkt ( $n=12$ ).



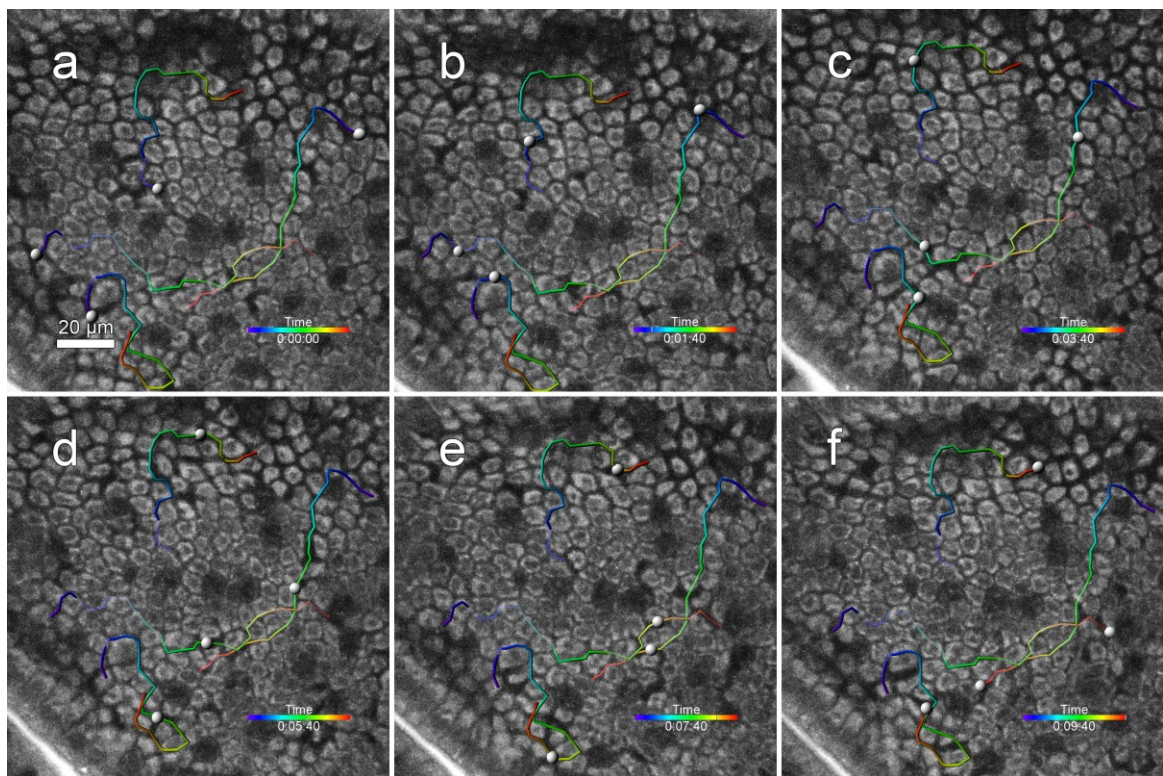


**Abbildung 4.11** Zusammenhang zwischen Bestrahlungsintensitäten und dem Abfall der Migrationsgeschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten über die ersten 40 Zeitpunkte (10 min). **(a)** Abfall der Geschwindigkeit bei Bestrahlungsintensitäten von durchschnittlich  $212 \text{ Ws/mm}^3$  ( $SD \pm 91 \text{ Ws/mm}^3$ ). Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 710 \text{ nm}$ . Bezogen auf die Anfangsgeschwindigkeit verringert sich die mittlere Migrationsgeschwindigkeit der IEL nach 10 min um rund 78,5% ( $n=4$  Mäuse,  $n=12$  Datensätze,  $n=168$  intraepitheliale Lymphozyten). Die Mittelwerte pro Zeitpunkt sind angegeben. **(b)** Das Verhältnis der Bestrahlungsdichte des Gewebes ( $\text{Ws/mm}^3$ ) zum prozentualen Abfall der Migrationsgeschwindigkeit zu jedem Zeitpunkt zeigt den korrelierenden Zusammenhang beider Parameter. Je höher die Bestrahlungsintensität, desto stärker ist auch die Abnahme der Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten pro Zeitpunkt ( $n=20$  Mäuse,  $n=60$  Datensätze).

Auch ein wiederholtes Aufzeichnen bereits phototoxisch geschädigter IEL einige Stunden nach dem initialen Stehenbleiben in intaktem Epithel zeigt keinen erneuten Anstieg ihrer Motilität. Die intraepithelialen Lymphozyten verharren unbeweglich an ein und derselben Stelle im basalen Epithel und zeigen dabei eine oftmals abgerundete, sphärische Zellform (Daten nicht gezeigt). Um den Einfluss phototoxischer Effekte innerhalb des bestrahlten Gewebes zu verringern und einen Abfall der Migrationsgeschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten während der Laser-induzierten Aufzeichnungen zu minimieren, wurden nachfolgende 3D-Zeitserien daher mit den geringstmöglichen Bestrahlungsintensitäten, somit jedoch auch mit einem begrenzten, zur Analyse gerade ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnis aufgezeichnet.

#### 4.3.1.2 Migrationsverhalten der IEL

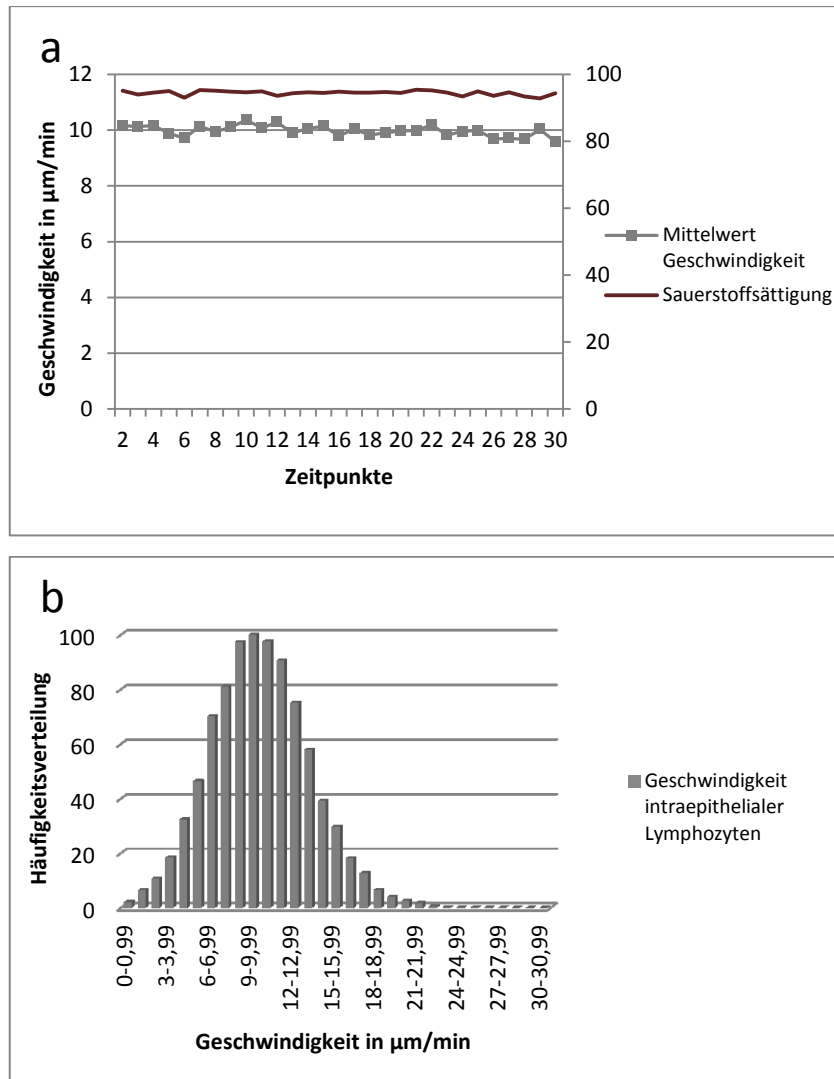
Infolge der verminderten phototoxischen Belastung konnte das Migrationsverhalten und die Dynamik der intraepithelialen Lymphozyten innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte praktisch ohne Beeinträchtigung der Geschwindigkeit aufgezeichnet und quantifiziert werden. Aufgrund der unterschiedlichen zeitlichen Auflösungen aufgezeichneter 3D-Zeitserien erstrecken sich die, in die Auswertung einbezogenen Daten dabei über eine Absolutzeit von 8–15 min. Um eine quantitative Analyse der Zelldynamik innerhalb des Epithelverbands zu ermöglichen, wurde die Position der IEL im 3D-Bildstapel manuell im Datensatz markiert und die Bewegung einzelner Zellen zwischen aufeinanderfolgenden Zeitpunkten verfolgt (Abbildung 4.12 und Movie 4.12).



**Abbildung 4.12. Movie 4.12** Migration der intraepithelialen Lymphozyten durch das basale Zottenepithel. Ausgewählte optische Schnitte der ersten 30 Zeitpunkte (9 min 40 sec) einer 3D-Zeitserie, aufgenommen mit einer Bestrahlungsdichte von  $19 \text{ Ws/mm}^3$ . Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 710 \text{ nm}$ , Bildausschnitt  $133 \mu\text{m} \times 133 \mu\text{m}$ , zeitliche Auflösung 20 sec. Die Lamina propria ist teilweise angeschnitten. Vereinzelt vorkommende Becherzellen erscheinen dunkel. Die migrierenden IEL können als nicht-fluoreszierende Erweiterungen des Interzellularraums identifiziert werden. Zur besseren Veranschaulichung sind die Migrationswege und gesetzten Spots ausgewählter IEL über die Beobachtungszeit dargestellt. Der Verlauf der Zeitachse ist farbkodiert (**a-f**).

Anhand der Raumkoordinaten ihres Zellmittelpunktes konnte die Geschwindigkeit sowie zurückgelegte Entfernung individueller intraepithelialer Lymphozyten im epithelialen Zellzwischenraum quantifiziert werden. Die Geschwindigkeit ergibt sich dabei aus der zurückgelegten Wegstrecke in Bezug zur dafür benötigten Zeit und ist als mittlere momentane Geschwindigkeit für jeden Zeitpunkt sowie gemittelt für einzelne IEL (Einzelzell-Geschwindigkeit) über mindestens 20 Zeitpunkte hinweg erfasst (ZINSELMAYER ET AL., 2009).

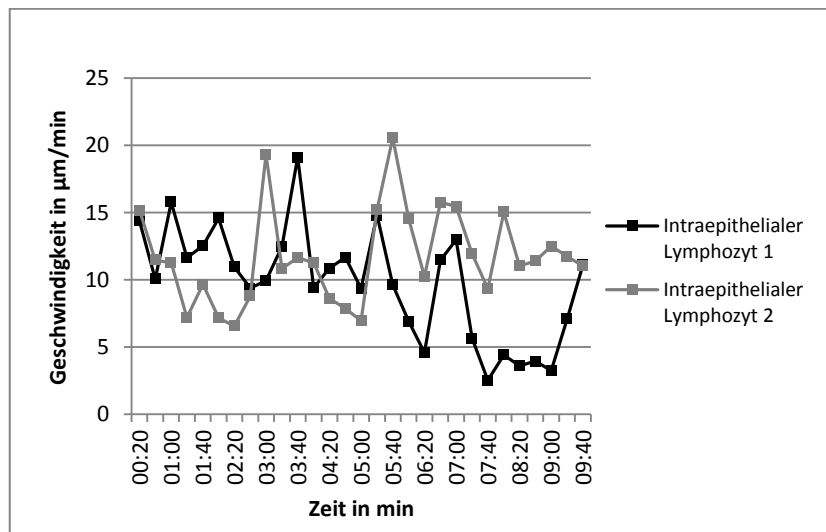
Innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte der Aufzeichnung bewegen sich die IEL mit einer mittleren momentanen Geschwindigkeit von rund  $10,0 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 3,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ) durch das Epithel intestinaler Zotten ( $n=16$  Mäuse,  $n=6741$  intraepitheliale Lymphozyten) und legen dabei Entfernungen von durchschnittlich  $89,6 \mu\text{m}$  ( $SD \pm 17,9 \mu\text{m}$ ) zurück ( $n=31$  intraepitheliale Lymphozyten). Wie die Häufigkeitsverteilung der mittleren momentanen Geschwindigkeiten in Abbildung 4.13 b zeigt, ist die Grundgesamtheit der numerischen Daten annähernd symmetrisch und normalverteilt ( $n=13434$ ). So liegen etwa 70% aller Geschwindigkeiten innerhalb der Entfernung der Standardabweichung zum Mittelwert ( $n=9353$ ). Obwohl die momentane Geschwindigkeit einzelner intraepithelialer Lymphozyten zu einem Zeitpunkt stark variiert, bewegen sich nahezu alle, über die Beobachtungszeit quantifizierten IEL kontinuierlich fort. Der Großteil der Lymphozyten wandert dabei mit  $8\text{--}11 \mu\text{m}/\text{min}$  durch das Zottenepithel. Einige wenige IEL erreichen auch momentane Geschwindigkeiten von über  $25 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n=5$ ), wobei die ermittelte Maximalgeschwindigkeit  $27,1 \mu\text{m}/\text{min}$  beträgt. Lediglich 0,95% der quantifizierten, mittleren momentanen Geschwindigkeiten innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte liegen unter  $2 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n=127$ ). Geschwindigkeiten unter  $2 \mu\text{m}/\text{min}$  können als Stillstand definiert, vorübergehend auftretend jedoch als Pausieren bzw. kurzes Verweilen angesehen werden (siehe auch BELTMAN ET AL., 2009). Über mehrere Zeitpunkte an einer Stelle verharrende, stationäre oder womöglich phototoxisch geschädigte IEL wurden bei mittleren Bestrahlungsintensitäten von  $14 \text{Ws}/\text{mm}^3$  innerhalb der ersten 8–15 min jedoch nicht beobachtet.



**Abbildung 4.13** Mittlere momentane Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte (8–15 min) sowie die Häufigkeitsverteilung der ermittelten Geschwindigkeiten. **(a)** Die IEL bewegen sich mit einer mittleren momentanen Geschwindigkeit von  $10,0 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 3,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ) durch den epithelialen Zellverband ( $n=6741$ ). Die exemplarisch aufgezeichnete Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut beträgt dabei durchschnittlich  $94,5\%$  ( $SD \pm 0,9\%$ ). **(b)** Häufigkeitsverteilung der Geschwindigkeiten innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte der Aufzeichnung ( $n=13434$ ). Die Grundgesamtheit der ermittelten Geschwindigkeiten zeigt eine Normalverteilung. Die Häufigkeitsverteilung ist symmetrisch, unimodal und erreicht ihr Maximum bei rund  $9 \mu\text{m}/\text{min}$ .

Die zurückgelegte Entfernung einzelner IEL variiert innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte der Aufzeichnung in einem Bereich zwischen  $56,4 \mu\text{m}$  und  $126,9 \mu\text{m}$  ( $n=31$  intraepitheliale Lymphozyten). Um zu überprüfen, ob einzelne IEL unterschiedlich schnell durch das Zottenepithel migrieren, wurde der Mittelwert der Geschwindigkeit individueller Lymphozyten über mindestens 20 Zeitpunkte hinweg bestimmt. Wie die Auswertung der Einzel-

zell-Geschwindigkeit belegt, bewegen sich einzelne IEL kontinuierlich, jedoch unterschiedlich schnell durch das Epithel. So beträgt die Minimalgeschwindigkeit eines verfolgten intraepithelialen Lymphozyts über 20–30 Zeitpunkte im Mittel  $5,6 \mu\text{m}/\text{min}$ , die ermittelte Maximalgeschwindigkeit eines anderen dagegen rund  $14,8 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n=83$  intraepitheliale Lymphozyten). Mit durchschnittlich  $9,7 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 1,9 \mu\text{m}/\text{min}$ ) ist der Mittelwert aller Einzelzell-Geschwindigkeiten jedoch mit dem der mittleren momentanen (vgl.  $10,0 \mu\text{m}/\text{min}$ ) vergleichbar. Die Abbildung 4.14 zeigt exemplarisch die Einzelzell-Geschwindigkeit zweier quantifizierter IEL über eine Beobachtungsdauer von 9 min 40 sec (30 Zeitpunkte). Nicht nur die momentane Geschwindigkeit verschiedener intraepithelialer Lymphozyten zu einem Zeitpunkt variiert, auch die Einzelzell-Geschwindigkeit individueller IEL über die Zeit unterliegt starken Schwankungen und ist selten kontinuierlich gleichbleibend schnell.



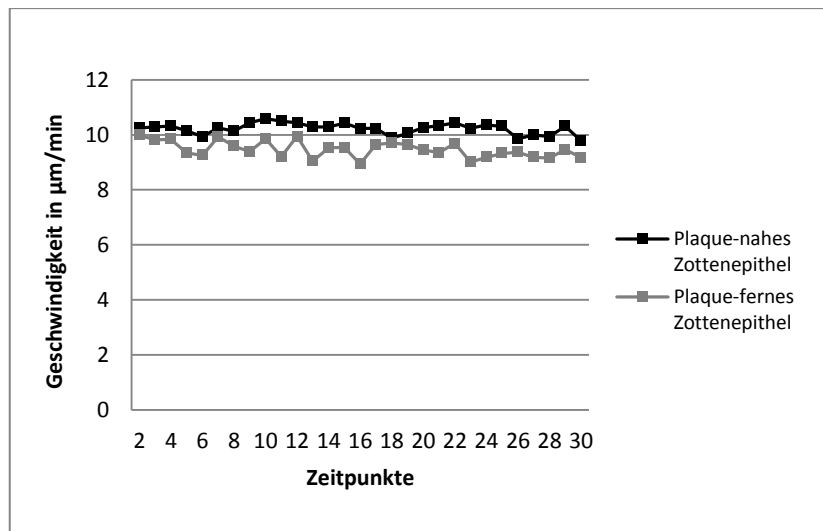
**Abbildung 4.14** Einzelzell-Geschwindigkeit zweier ausgewählter intraepithelialer Lymphozyten über eine Beobachtungsdauer von 9 min 40 sec (30 Zeitpunkte). Während sich die mittlere momentane Geschwindigkeit aus dem Mittelwert der Geschwindigkeiten aller IEL zu einem Zeitpunkt ableitet, berechnet sich die Einzelzell-Geschwindigkeit aus der mittleren Geschwindigkeit eines IEL über die Beobachtungszeit von 20–30 Zeitpunkten und variiert zwischen  $5,6$  und  $14,8 \mu\text{m}/\text{min}$ . So migrieren individuelle intraepitheliale Lymphozyten unterschiedlich schnell durch das intestinale Epithel. Dabei unterliegt jedoch auch die momentane Geschwindigkeit jedes einzelnen IEL von einem Zeitpunkt zum nächsten starken Schwankungen und ist selten konstant.

#### 4.3.1.3 Zusammenhang zwischen Zottenstandort und Migrationsgeschwindigkeit

Durch die methodisch bedingte Verlagerung einer ausgewählten Dünndarmschlinge auf ein extrakorporal beheiztes Fingerplättchen definierter Größe konnte zu einem Zeitpunkt ein maximal 7 mm x 7 mm messendes Areal der Darmschleimhaut betrachtet werden. Um zu überprüfen, ob sich das Migrationsverhalten der IEL innerhalb verschiedener Regionen des Dünndarms unterscheidet, wurde die Lymphozyten-Dynamik im Epithel Peyer-Plaques-naher und Peyer-Plaques-ferner Zotten miteinander verglichen und somit quantitative Aussagen über den Einfluss des Standortes einer Zotte auf die Migrationsgeschwindigkeit der IEL getroffen. Dazu wurden die quantifizierten Daten der mittleren momentanen Geschwindigkeiten innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte weiter unterteilt, abhängig vom Standort der intestinalen Zotten in Bezug zu den makroskopisch sichtbaren, lymphatischen Einzelnoduli (Abbildung 4.15).

Im Epithel Plaque-ferner Zotten migrieren die IEL mit einer mittleren momentanen Geschwindigkeit von durchschnittlich  $9,5 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 3,7 \mu\text{m}/\text{min}$ ) ( $n=649$  intraepitheliale Lymphozyten) und legen während ihrer Wanderung innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte Entfernungen von im Mittel  $84,6 \mu\text{m}$  ( $SD \pm 19,5 \mu\text{m}$ ) zurück ( $n=18$ ). Mit rund  $10,2 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 3,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ) ( $n=6092$  intraepitheliale Lymphozyten) und durchschnittlich zurückgelegten  $96,5 \mu\text{m}$  ( $SD \pm 13,1 \mu\text{m}$ ) ( $n=13$ ) unterscheidet sich die Migration intraepithelialer Lymphozyten im Epithelverband Plaque-naher Zotten davon hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Die relative Häufigkeitsverteilung der mittleren momentanen Minimal- bzw. Maximalgeschwindigkeiten von einem Zeitpunkt zum nächsten ist dabei jedoch nahezu identisch. Während im Epithel Plaque-ferner Zotten rund 0,99% der mittleren momentanen Geschwindigkeiten innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte der Aufzeichnung unter  $2 \mu\text{m}/\text{min}$  und lediglich etwa 0,05% über  $25 \mu\text{m}/\text{min}$  liegen ( $n=4442$ ), sind es im Epithel Plaque-naher Zotten 0,92% unter  $2 \mu\text{m}/\text{min}$  und rund 0,03% über  $25 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n=8992$ ).



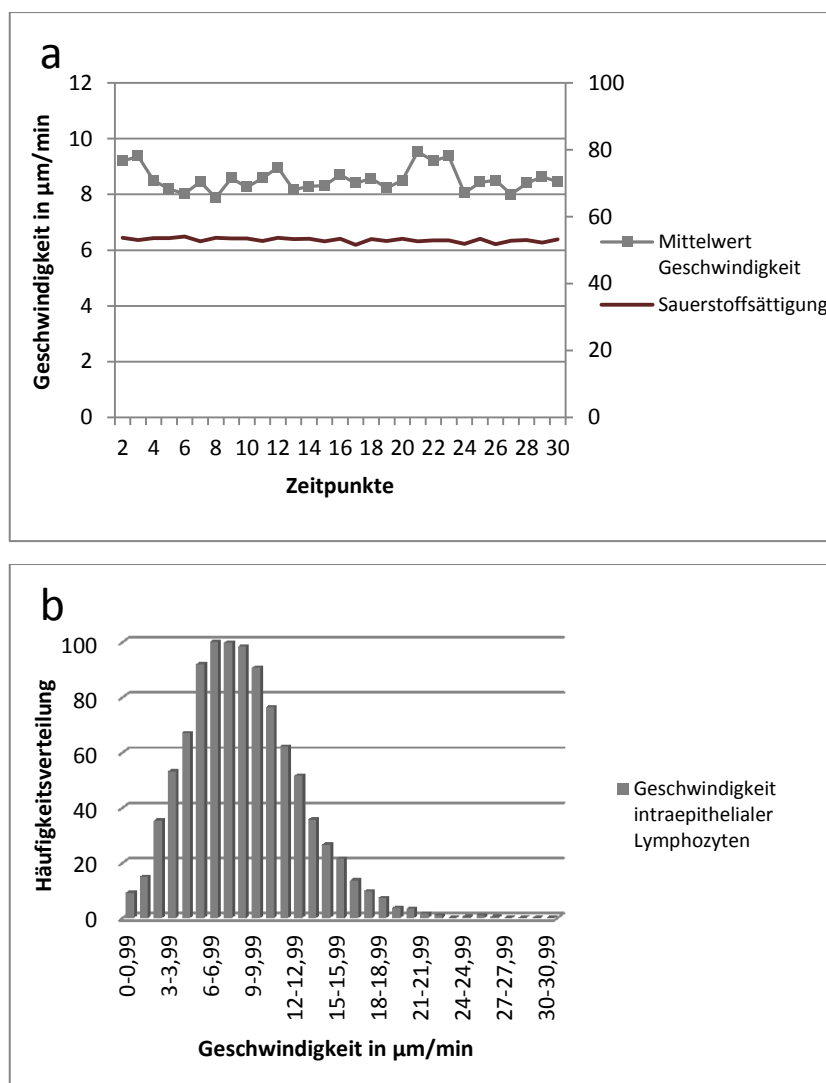


**Abbildung 4.15** Vergleich der mittleren momentanen Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten im Epithel Plaque-naher und Plaque-ferner Zotten innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte der Aufzeichnung. Die IEL migrieren mit einer mittleren momentanen Geschwindigkeit von rund  $9,5 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 3,7 \mu\text{m}/\text{min}$ ) im Plaque-fernen Zottenepithel ( $n=4$  Mäuse,  $n=649$  intraepitheliale Lymphozyten). Mit durchschnittlich  $10,2 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 3,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ) unterscheidet sich die Migrationsgeschwindigkeit der IEL im Epithel Plaque-naher Zotten davon statistisch hochsignifikant ( $n=13$  Mäuse,  $n=6092$  intraepitheliale Lymphozyten). Die relative Häufigkeitsverteilung der Minimal- bzw. Maximalgeschwindigkeiten ist jedoch nahezu identisch.

#### 4.3.1.4 Einfluss der Sauerstoffsättigung auf die Migrationsgeschwindigkeit

Infolge der maschinellen Beatmung liegt die Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut der Maus während der intravitalen Aufzeichnungen konstant über 92%. Unter Narkose spontan atmende Mäuse zeigen dagegen eine deutlich niedrigere Sauerstoffsättigung, und damit einhergehend auch eine geringere mittlere momentane Geschwindigkeit innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte. Bei einer durchschnittlichen Sauerstoffsättigung von rund 53,5% ( $SD \pm 1,2\%$ ) bewegen sich die intraepithelialen Lymphozyten mit einer mittleren momentanen Geschwindigkeit von nur noch  $8,5 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 4,0 \mu\text{m}/\text{min}$ ) durch das intestinale Epithel ( $n=363$  intraepitheliale Lymphozyten). Die ermittelte momentane Maximalgeschwindigkeit von einem Zeitpunkt zum nächsten beträgt dabei  $26,5 \mu\text{m}/\text{min}$  und unterscheidet sich somit kaum von der intraepithelialer Lymphozyten im Zottenepithel intubierter, maschinell beatmeter Mäuse (vgl.  $27,1 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Der prozentuale Anteil der momentanen Geschwindigkeiten über  $25 \mu\text{m}/\text{min}$  ist mit 0,13% sogar deutlich erhöht ( $n=4$ ). Mit 2,46% liegen innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte jedoch auch deutlich mehr Geschwindigkeiten unter  $2 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n=74$ ). Die innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte zurück-

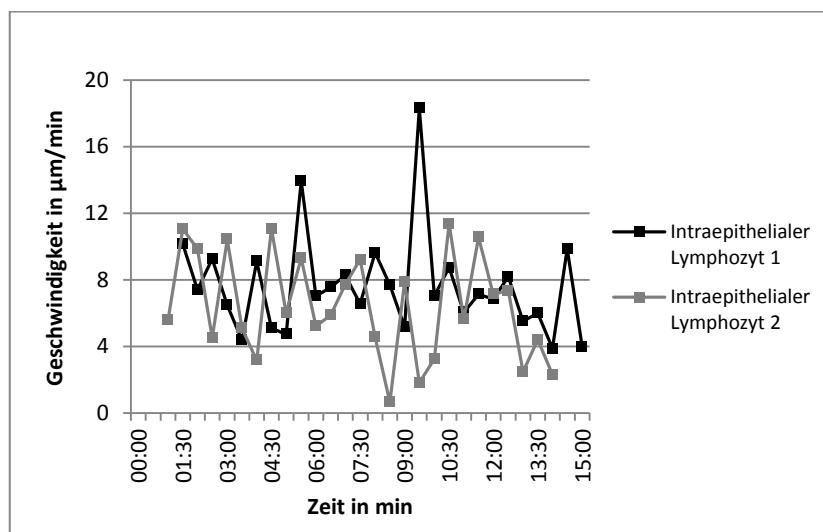
gelegte Wegstrecke verringert sich bei geringerer Sauerstoffsättigung auf durchschnittlich  $86,6 \mu\text{m}$  ( $SD \pm 15,0 \mu\text{m}$ ) ( $n=17$  intraepitheliale Lymphozyten). Die mittleren momentanen Geschwindigkeiten über eine Beobachtungszeit von 30 Zeitpunkten sowie die exemplarisch bestimmte Sauerstoffsättigung einer narkotisierten, spontan atmenden Maus sind in Abbildung 4.16 a dargestellt. Die Geschwindigkeiten der intraepithelialen Lymphozyten bei einer geringeren Sauerstoffsättigung zeigen ebenfalls eine Normalverteilung (Abbildung 4.16 b), wobei sich ihr Maximum deutlich nach links verschoben darstellt ( $n=3012$ ). Der Unterschied zur mittleren momentanen Migrationsgeschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten in maschinell beatmeten Mäusen ist statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 4.16** Mittlere momentane Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte der Aufzeichnung (7 min 30 sec bis 15 min) sowie die dazugehörige Häufigkeitsverteilung der Geschwindigkeiten in spontan atmenden Mäusen. (a) Die IEL migrieren bei einer geringeren Sauerstoffsättigung des arteriellen Blutes mit einer mittleren Geschwindigkeit von  $8,5 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 4,0 \mu\text{m}/\text{min}$ )

durch den Epithelzellverband (n=6 Mäuse, n=363 intraepitheliale Lymphozyten). Die Sauerstoffsättigung im Blut nicht-intubierter, spontan atmender Mäuse beträgt dabei durchschnittlich 53,5% ( $SD \pm 1,2\%$ ). **(b)** Wie die Häufigkeitsverteilung der ermittelten Geschwindigkeiten zeigt, ist die Grundgesamtheit der numerischen Daten annähernd symmetrisch und normalverteilt (n=3012), und erreicht ihr Maximum bei rund 7  $\mu\text{m}/\text{min}$ .

Auch bei einer niedrigeren Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut bewegen sich einzelne intraepitheliale Lymphozyten aufgrund variierender Einzelzell-Geschwindigkeiten unterschiedlich schnell durch das intestinale Zottenepithel (Abbildung 4.17). Wie die Analyse der Einzelzell-Geschwindigkeit über 20–30 Zeitpunkte zeigt, beträgt die Minimalgeschwindigkeit eines IEL dabei 5,7  $\mu\text{m}/\text{min}$  und unterscheidet sich somit kaum von der intraepithelialer Lymphozyten im Zottenepithel beatmeter Mäuse. Dagegen liegt die maximale Migrationsgeschwindigkeit der eines individuellen Lymphozyts über die Zeit lediglich bei 11,4  $\mu\text{m}/\text{min}$  und damit rund 3,4  $\mu\text{m}/\text{min}$  niedriger als die eines IEL bei erhöhter Sauerstoffsättigung (n=38 intraepitheliale Lymphozyten). Mit durchschnittlich 8,3  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$ ) ist der Mittelwert aller Einzelzell-Geschwindigkeiten intraepithelialer Lymphozyten bei niedrigeren Sauerstoffsättigungen jedoch ebenfalls nahezu identisch zu dem der mittleren momentanen Geschwindigkeiten. Entsprechend der sich unterscheidenden Geschwindigkeiten einzelner IEL über die Zeit variiert auch die zurückgelegte Entfernung innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte zwischen 57,3  $\mu\text{m}$  und 109,9  $\mu\text{m}$  (n=17 intraepitheliale Lymphozyten).



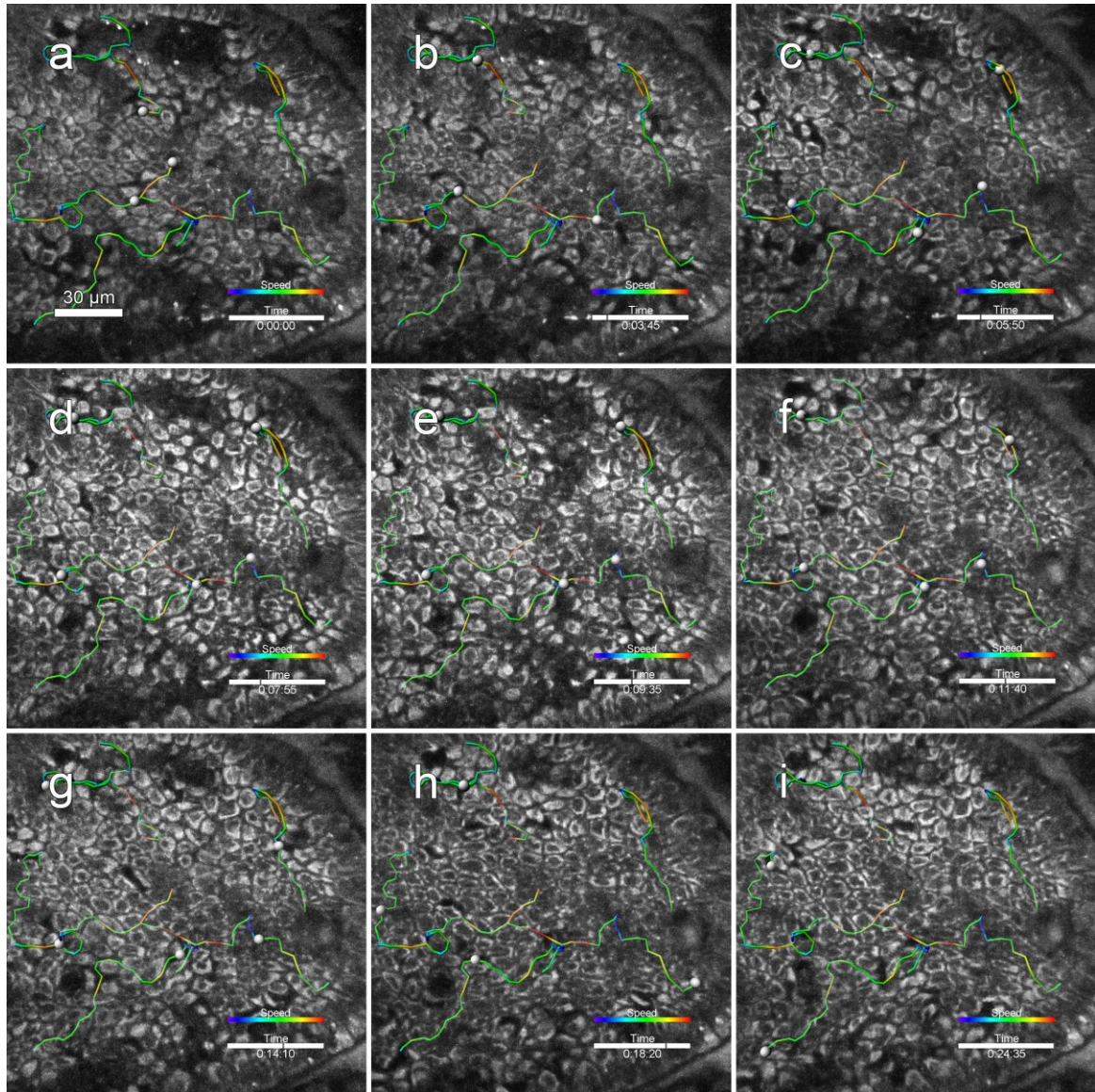
**Abbildung 4.17** Einzelzell-Geschwindigkeit zweier ausgewählter intraepithelialer Lymphozyten zu jedem Zeitpunkt über eine Dauer von 15 min (30 Zeitpunkten). Auch bei einer Sauerstoffsättigung von durchschnittlich 53,5% ( $SD \pm 1,2\%$ ) migrieren individuelle IEL unterschiedlich schnell, verglichen mit höheren Sättigungen jedoch signifikant langsamer durch das intestinale Zottenepithel ( $p < 0,001$ ). Der Mittelwert der

Einzelzell-Geschwindigkeiten intraepithelialer Lymphozyten in spontan atmenden Mäusen beträgt durchschnittlich  $8,3 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$ ) ( $n=38$  intraepitheliale Lymphozyten). Die Einzelzell-Geschwindigkeit individueller IEL variiert dabei zwischen  $5,7$  und  $11,4 \mu\text{m}/\text{min}$ .

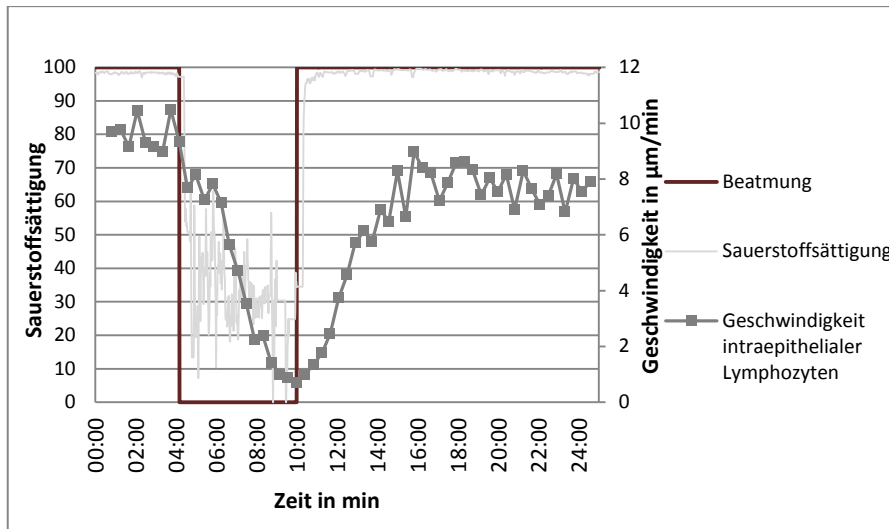
#### *4.3.1.5 Einfluss der Sauerstoffminderversorgung auf die Migrationsgeschwindigkeit*

Die beschriebenen Unterschiede zwischen den mittleren Geschwindigkeiten intraepithelialer Lymphozyten innerhalb spontan atmender und maschinell beatmeter Mäuse deuten auf eine Abhängigkeit ihres Migrationsverhaltens vom Sauerstoffgehalt im Gewebe hin. Um den Einfluss der Sauerstoffsättigung auf die Migrationsgeschwindigkeit der intraepithelialen Lymphozyten im intestinalen Epithel genauer zu untersuchen, wurde das Beatmungsgerät intubierter Mäuse während laufender Aufzeichnungen von 3D-Zeitserien kontrolliert über eine definierte Zeit hinweg abgestellt und so ein kurzzeitiger Zustand der Sauerstoffminderversorgung (Hypoxämie) erzeugt. Unter Überprüfung der Vitalparameter und fortlaufender Erfassung der Sauerstoffsättigung daraufhin spontan weiteratmender Mäuse konnte somit das Migrationsverhalten der IEL in Abhängigkeit zur sich ändernden Sättigung im arteriellen Blut untersucht und quantifiziert werden.

Unmittelbar nach dem Abschalten der Beatmung sinkt die Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut auf Werte von 30–40%. Das Autofluoreszenz-Signal des intestinalen Zottenepithels verstärkt sich daraufhin deutlich. Die Abnahme der Sauerstoffsättigung zeigt einen sofortigen, d.h. im Rahmen der verfügbaren Zeitauflösung aufgezeichneten Effekt auf das Migrationsverhalten der IEL. So fällt mit sinkender Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut auch die Geschwindigkeit der IEL im Epithel intestinaler Zotten rapide ab, bis schließlich nahezu alle Lymphozyten im basalen Interzellularraum still stehen. Während sich einzelne intraepitheliale Lymphozyten abrunden, pendeln andere noch an einer Stelle hin und her, ändern anfänglich häufig ihre Bewegungsrichtung und strecken längliche Fortsätze in umliegende Zellzwischenräume. Im Unterschied zu phototoxisch geschädigten IEL beginnen die Lymphozyten jedoch bereits einen Zeitpunkt nach dem Einschalten des Beatmungsgeräts und dem damit einhergehenden, unmittelbaren Anstieg der Sauerstoffsättigung im Blut erneut mit ihrer Migration durch das Zottenepithel (Abbildung 4.18 und Movie 4.18).



**Abbildung 4.18. Movie 4.18** Migrationsverhalten intraepithelialer Lymphozyten in Abhängigkeit der sich ändernden Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut. Ausgewählte optische Schnitte einer 3D-Zeitserie durch das basale Zottenepithel über eine Beobachtungsdauer von 24 min 35 sec. Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 710 \text{ nm}$ , Bildausschnitt  $142 \mu\text{m} \times 142 \mu\text{m}$ , zeitliche Auflösung 25 sec. Zur besseren Veranschaulichung sind die Migrationswege ausgewählter IEL über die Zeit schematisch dargestellt und die Einzelzell-Geschwindigkeiten jeweils farbkodiert (a-i). Durch das Abschalten der maschinellen Beatmung 4 min 10 sec nach Beginn der Aufzeichnung wurde ein Zustand der temporären Hypoxämie erzeugt. Mit dem Abfall der Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut fällt auch die Geschwindigkeit der IEL rapide ab, bis schließlich alle Lymphozyten still stehen. Das Autofluoreszenz-Signal der Enterozyten verstärkt sich über die Dauer der Hypoxämie deutlich, nimmt jedoch mit steigender Sauerstoffsättigung wieder ab. Unmittelbar nach dem Einschalten des Beatmungsgeräts, exakt 9 min 35 sec nach Beginn der Aufzeichnung, beginnen die IEL erneut mit ihrer Migration durch das basale Zottenepithel (e-i).

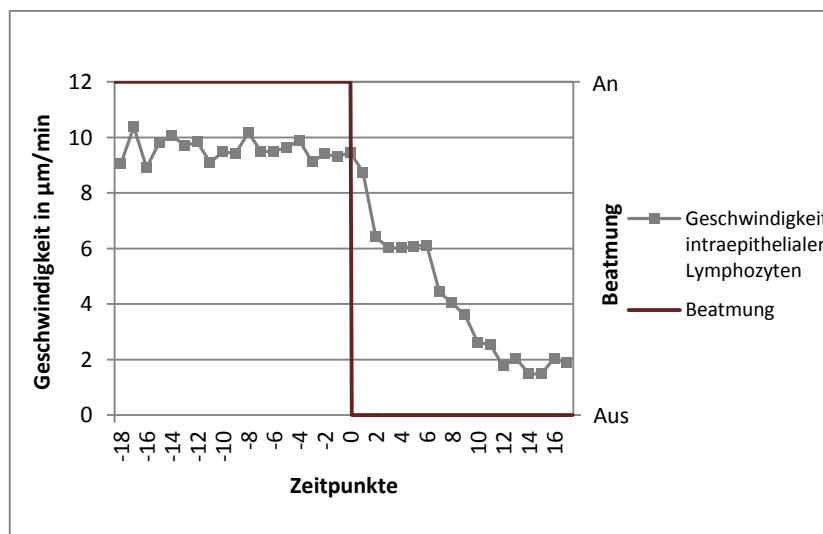


**Abbildung 4.19** Die mittlere momentane Geschwindigkeit von IEL in Abhängigkeit zur Sauerstoffsättigung über die Beobachtungsdauer der in Abbildung 4.18 exemplarisch dargestellten 3D-Zeitserie. Die zwischenzeitliche Unterbrechung der maschinellen Beatmung (rote Linie) erfolgte über 5 min 25 sec (insgesamt 14 Zeitpunkte).

Um die Abnahme der Geschwindigkeit der intraepithelialen Lymphozyten mit abfallender Sauerstoffsättigung quantifizieren zu können, wurde der Zeitpunkt des Beginns der Hypoxämie auf 0 gesetzt und so auf einen Zeitpunkt normiert. Wie die Abbildung 4.20 zeigt, bewegen sich die IEL während anfänglich konstanter Beatmung der Maus mit durchschnittlich  $9,6 \mu\text{m/min}$  ( $SD \pm 3,4 \mu\text{m/min}$ ) durch das intestinale Zottenepithel ( $n=5$  Mäuse). Die Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut beträgt dabei im Mittel  $96,9\%$  ( $SD \pm 0,7\%$ ), fällt jedoch bereits 2 Zeitpunkte nach dem Abschalten der maschinellen Beatmung auf Werte unter  $40\%$  und bleibt über die Dauer der Hypoxämie bei durchschnittlich  $35,1\%$  ( $SD \pm 7,3\%$ ). Mit der Sauerstoffsättigung fällt auch die mittlere momentane Geschwindigkeit der IEL bereits 2 Zeitpunkte nach dem Beginn der Hypoxämie auf rund  $6,4 \mu\text{m/min}$  ( $SD \pm 4,1 \mu\text{m/min}$ ) ( $n=259$  Geschwindigkeiten), nimmt im Folgenden fortlaufend ab und erreicht weitere 10 Zeitpunkte später mit durchschnittlich  $1,8 \mu\text{m/min}$  ( $SD \pm 1,7 \mu\text{m/min}$ ) ihr Minimum ( $n=475$  Geschwindigkeiten). Während vor dem Abfall der Sauerstoffsättigung lediglich rund  $0,46\%$  der ermittelten momentanen Geschwindigkeiten der IEL unter  $2 \mu\text{m/min}$  liegen, erhöht sich der prozentuale Anteil über die Dauer der Hypoxämie auf  $28,5\%$ . Der Stillstandskoeffizient, bestimmt durch das Verhältnis der Zeit einzelner, stehengebliebener IEL zur Absolutzeit der Hypoxämie (siehe auch ZINSELMAYER ET AL., 2009), beträgt dabei  $0,38$  ( $SD \pm 0,14$ ). Somit liegt die momentane Geschwindigkeit eines



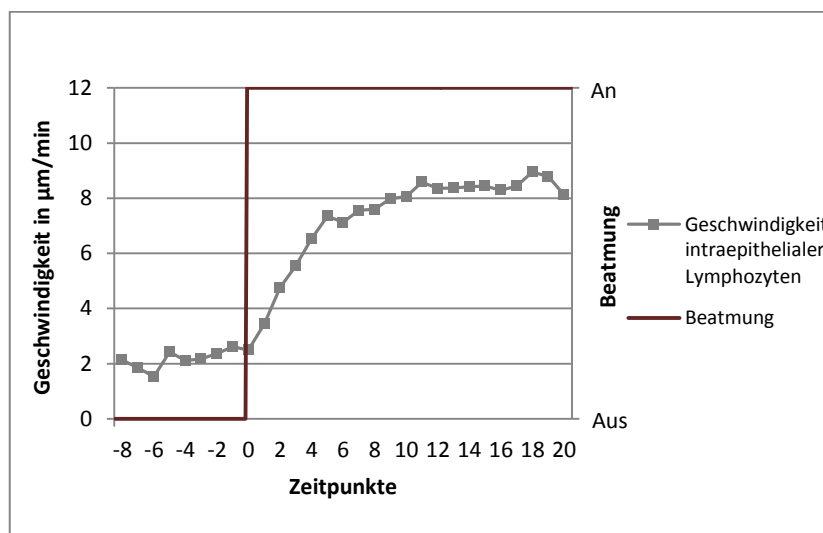
individuellen intraepithelialen Lymphozyts in durchschnittlich rund 40% der Zeitpunkte nach einer abfallenden Sauerstoffsättigung unter  $2 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n=85$  intraepitheliale Lymphozyten). Ein gleichbleibend dynamisches Migrationsverhalten der IEL im Epithel konnte mit zunehmender Dauer der Hypoxämie in keinem der Versuche beobachtet werden ( $n=15$  Ereignisse). Die scheinbar noch immer vorhandene, geringe mittlere momentane Migrationsgeschwindigkeit ( $< 2 \mu\text{m}/\text{min}$ ) stellt ein Meßartefakt dar und liegt in der intravital kaum gänzlich vermeidbaren Darmperistaltik und Gewebsbewegung infolge kontraktile glatter Muskelfasern begründet.



**Abbildung 4.20** Abfall der mittleren momentanen Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten in Abhängigkeit zur Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut ( $n=5$  Mäuse). Nach dem Abstellen der maschinellen Beatmung (vertikale rote Linie) sinkt die Sauerstoffsättigung von durchschnittlich 96,9% ( $SD \pm 0,7\%$ ) auf 35,1% ( $SD \pm 7,3\%$ ). Mit der Abnahme der Sättigung fällt auch die mittlere momentane Geschwindigkeit der IEL und erreicht 12 Zeitpunkte nach Beginn der Hypoxämie mit rund  $1,8 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 1,7 \mu\text{m}/\text{min}$ ) ihr Minimum. Mit zunehmender Dauer der Sauerstoffminderversorgung konnten keine Migrationsbewegungen der IEL durch das Epithel mehr beobachtet werden ( $n=15$  Ereignisse).

Wie der anschließende Wechsel auf erneute maschinelle Beatmung zeigt, entspricht die Änderung des Migrationsverhaltens intraepithelialer Lymphozyten der spezifischen Empfindlichkeit der Lymphozyten auf die Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut. Bereits ein Zeitintervall nach dem Wieder-Einschalten des Beatmungsgeräts und dem damit einhergehenden, unmittelbaren Anstieg der Sauerstoffsättigung auf Werte von durchschnittlich 98,1% ( $SD \pm 1,0\%$ ) beginnen die zuvor stehengebliebenen IEL erneut mit ihrer Migration durch das basale Epithel. Die Auswertung der mittleren momentanen Geschwindigkeit der

intraepithelialen Lymphozyten zeigt eine deutliche Zunahme innerhalb der ersten 10 Zeitpunkte nach dem Wieder-Einschalten des Beatmungsgeräts von durchschnittlich  $2,3 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 2,0 \mu\text{m}/\text{min}$ ) auf rund  $8,4 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 3,7 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Einige IEL erreichen, resultierend aus der wieder ansteigenden Sauerstoffsättigung, erneut momentane Geschwindigkeiten von über  $23 \mu\text{m}/\text{min}$ . Ihre ursprüngliche mittlere Ausgangsgeschwindigkeit erreichen die IEL jedoch nicht mehr. Trotz der niedrigeren mittleren Migrationsgeschwindigkeit zeigen die IEL eine, im Anschluss an ihr initiales Stehenbleiben fortlaufende und kontinuierliche Wanderungsbewegung durch das basale Zottenepithel über eine nachfolgende Beobachtungszeit von 7 min und 55 sec ( $n=4$  Mäuse,  $n=944$  intraepitheliale Lymphozyten,  $n=14$  Ereignisse). Wie Abbildung 4.21 zeigt, wurde auch für die Auswertung der Geschwindigkeitszunahme der IEL bei steigender Sauerstoffsättigung der Beginn der erneuten Beatmung auf einen Startpunkt normiert.



**Abbildung 4.21** Anstieg der mittleren momentanen Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten in Abhängigkeit zur Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut ( $n=14$  Ereignisse). Mit dem Wieder-Einschalten der maschinellen Beatmung (vertikale rote Linie) steigt die Sauerstoffsättigung auf durchschnittlich 98,1% ( $SD \pm 1,0\%$ ). Mit der Zunahme der Sättigung steigt auch die mittlere momentane Geschwindigkeit der IEL, und erreicht 10 Zeitpunkte nach dem Ende der Hypoxämie rund  $8,4 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 3,7 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Im Anschluss an ihr initiales Stehenbleiben migrieren die IEL erneut durch das Epithel der Zotten.

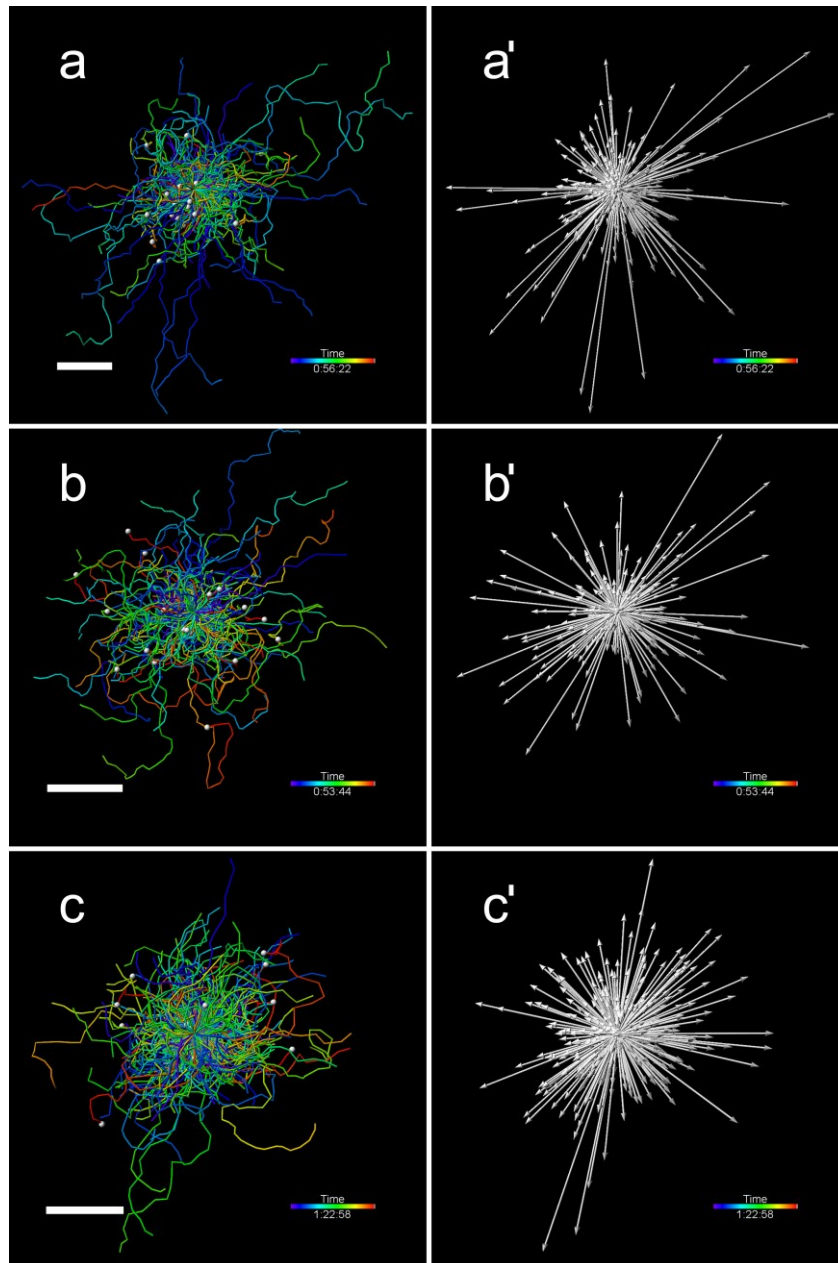
Die Abnahme der mittleren momentanen Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten während anhaltender Sauerstoffmindersversorgung des Gewebes vom Ausgangswert auf durchschnittlich  $2 \mu\text{m}/\text{min}$  ist statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Aufgrund der, aus den Ergebnissen resultierenden Korrelation zwischen der Migrationsgeschwindigkeit der



IEL und der Sauerstoffsättigung wurden die Mäuse bei nachfolgenden Aufzeichnungen dreidimensionaler Langzeitserien daher stets intubiert und über die gesamte Versuchsdauer hinweg kontinuierlich maschinell beatmet.

#### *4.3.1.6 Migrationsmuster der IEL*

Wie die 3D-Zeitserien zeigen, patrouillieren intraepitheliale Lymphozyten unter physiologischen Bedingungen stetig im Zellzwischenraum zwischen intestinalen Epithelzellen. Ihre Migration erfolgt dabei gleichmäßig verteilt in allen Regionen der Zotten. Während ihrer Wanderung durch das basale Epithel treffen die Lymphozyten immer wieder auf andere migrierende IEL, berühren und entfernen sich nach kurzer Kontaktzeit jedoch wieder voneinander. Durch unmittelbare Richtungswechsel scheinen aufeinander zu patrouillierende IEL sogar längere Kontaktzeiten zu vermeiden. Um nachfolgend Aussagen über die Gerichtetheit und Effektivität ihrer Wanderungsbewegung treffen zu können, wurde im Anschluss an die Quantifizierung der Migrationsgeschwindigkeit und zurückgelegten -strecke das Migrationsmuster der IEL im intestinalen Zottenepithel näher untersucht. Durch die Aufzeichnung dreidimensionaler Langzeitserien (4D-Datensätze) konnten einzelne intraepitheliale Lymphozyten über mehr als 40 min (93 Zeitpunkte) verfolgt, der individuelle Startpunkt ihres Migrationspfads auf einen gemeinsamen Anfangspunkt normiert und somit die Bewegungsausrichtung aller im Bildfeld migrierenden IEL bestimmt werden. Abbildung 4.22 zeigt die Wanderungsbewegungen intraepithelialer Lymphozyten innerhalb des Epithels aus drei exemplarisch ausgewählten Langzeitserien.



**Abbildung 4.22** Migrationsmuster intraepithelialer Lymphozyten durch das basale Zottenepithel aus drei exemplarisch ausgewählten 3D-Langzeitserien über eine Beobachtungsdauer von bis zu 1 h 23 min (200 Zeitpunkten). Übereinander gelegte Migrationswege von **(a)** 284 IEL, **(b)** 197 IEL sowie **(c)** 319 IEL sind jeweils auf einen gemeinsamen Startpunkt normiert und über den Verlauf der Zeit farbkodiert. Maßstab 30  $\mu\text{m}$ . **(a'-c')** Abweichung der zurückgelegten Migrationsstrecke vom Start- hin zum Endpunkt. Jeder Pfeil entspricht dabei der direkten Verbindungslinie der Abweichung eines einzelnen IEL. Wie die Ausrichtung der Migrationspfade vom gemeinsamen Anfangspunkt aus beginnend zeigt, bewegen sich die im Bildfeld patrouillierenden intraepithelialen Lymphozyten ohne erkennbare Vorzugsrichtung in alle Richtungen der xy-Ebene. Die Migrationsrichtungen sind dabei annähernd gleich häufig verteilt, was eine Migration nach dem Zufallsprinzip impliziert (BELTMAN ET AL., 2009).

Die Visualisierung ihrer Migrationswege zeigt, dass sich intraepitheliale Lymphozyten auch über längere Beobachtungszeiten hinweg stetig durch das Zottenepithel bewegen und dabei enorme Entfernungen (bis zu 323,4  $\mu\text{m}$ ) zurücklegen. Trotz ihrer hohen Zellzahl von rund 480 Lymphozyten pro Zottenepithel erkunden und überwachen somit auch einzelne IEL ein weites Areal innerhalb des Epithelverbands. Ihr Bewegungsmuster erscheint dabei jedoch zufällig (Abbildung 4.22 a-c). Während sich einzelne IEL über kürzere Zeiträume (1–3 min) charakteristisch in eine gleichbleibende Richtung bewegen, erscheint ihre Migration über längere Beobachtungszeiten teilweise geradlinig, teilweise häufig ändernd und wenig einheitlich. Eine gerichtete Bewegung in eine Vorzugsrichtung konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr zeigen sich die verschiedenen, auf einen gemeinsamen Anfangspunkt normierten Migrationsrichtungen annähernd gleich verteilt (Abbildung 4.2 a'-c').

Um den qualitativen Eindruck der Migrationsausrichtung belegen und das -verhalten der IEL näher quantifizieren zu können, wurde neben der Entfernungsrates auch der Abweichungsindex bestimmt. Während die Entfernungsrates die Abweichung der Migrationsstrecke vom Start- hin zum Endpunkt eines Lymphozyten als direkte Verbindungslinie in Relation zur Zeit setzt, ergibt sich der Abweichungsindex aus der Abweichung des Start- und Endpunkts eines IEL in Bezug zur Gesamtlänge der von ihm zurückgelegten Entfernung (BELTMAN ET AL., 2009). Die Abweichung berechnet sich dabei aus der Raumdiagonale zwischen den xyz-Koordinaten des Start- sowie Endpunkts einer manuell markierten Lymphozytenbewegung durch das Zottenepithel. In die Auswertung wurden ausschließlich Migrationswege einzelner IEL über mindestens 50 Zeitpunkte hinweg einbezogen ( $n=52$  intraepitheliale Lymphozyten). Die mittlere zurückgelegte Entfernung der IEL über den Beobachtungszeitraum beträgt 187,1  $\mu\text{m}$  ( $SD \pm 56,4 \mu\text{m}$ ). Dabei entfernen sich die Lymphozyten durchschnittlich 63,8  $\mu\text{m}$  ( $SD \pm 31,8 \mu\text{m}$ ) von ihrem Ausgangspunkt. Wie Abbildung 4.22 a'-c' verdeutlicht, variiert die Abweichung jedoch in einem Bereich zwischen 19,7  $\mu\text{m}$  und 139,2  $\mu\text{m}$  stark. In Relation zur Zeit bewegen sich die IEL mit einer Entfernungsrates von 3,1  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 1,4 \mu\text{m}/\text{min}$ ) vom Ausgangspunkt ihrer Migration hin zum Endpunkt. Obwohl auch die mittlere Entfernungsrates dabei starken Schwankungen unterliegt und Werte zwischen 0,8  $\mu\text{m}/\text{min}$  und 7,4  $\mu\text{m}/\text{min}$  annimmt, unterscheidet sie sich doch signifikant von der ermittelten Einzelzell-Geschwindigkeit der IEL über mindestens 50 Zeitpunkte von durchschnittlich 8,5  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 1,4 \mu\text{m}/\text{min}$ ).

Als Maß für die Zielgerichtetheit einer Zellbewegung beschreibt der Abweichungsindex das Verhältnis der direkten Distanz zwischen Start- und Endpunkt einer Migration zur zurückgelegten Entfernung des intraepithelialen Lymphozyts auf dem Weg dorthin und

kann Werte zwischen 1 bei einer geradlinigen, zielgerichteten Migration und 0 bei einer Migration im Kreis einnehmen (BELTMAN ET AL., 2009). Mit einem mittleren Index von 0,35 ( $SD \pm 0,16$ ) weicht das Bewegungsmuster der IEL stark von einer direkten, geradlinigen Migration ab. Durch die hohe Variabilität der Werte zwischen 0,09 und 0,71 kann das zufällige Migrationsverhalten der IEL innerhalb des intestinalen Zottenepithels quantitativ bestätigt werden ( $n=52$  intraepitheliale Lymphozyten). Während ein einzelner ausgewählter Lymphozyt in 24 min 32 sec (93 Zeitpunkten) 214,4  $\mu\text{m}$  zurücklegt und sich 19,7  $\mu\text{m}$  vom Beginn seiner Migration entfernt, wandert ein anderer, unter gleichen experimentellen Bedingungen aufgezeichneter IEL über eine Beobachtungszeit von 18 min 20 sec (65 Zeitpunkten) lediglich 137,1  $\mu\text{m}$ , weicht jedoch rund 98  $\mu\text{m}$  von seinem Startpunkt ab.

Grafisch lässt sich das zufällige Bewegungsmuster als linearer Zusammenhang zwischen der mittleren Abweichung zur Quadratwurzel der Zeit darstellen (WEI ET AL., 2003). Da sich die Richtungen der anfänglich einheitlich und geradlinig vom gemeinsamen Anfangspunkt weg bewegendes IEL mit zunehmender Migrationsdauer zufällig ändern – einzelne Lymphozyten sogar zum initialen Startpunkt zurückkehren – steigt die mittlere Abweichung proportional zur Funktion der Quadratwurzel der Zeit (Abbildung 4.23).



**Abbildung 4.23** Das zufällige Bewegungsmuster der intraepithelialen Lymphozyten kann grafisch vom Verhältnis der mittleren Abweichung zur Quadratwurzel der Zeit ( $\text{min}^{1/2}$ ) abgeleitet werden. Die mittlere Abweichung ergibt sich dabei aus der kürzesten Distanz zwischen den xyz-Koordinaten der initialen Start- sowie jeweiligen Position und wächst als Funktion der Quadratwurzel der Zeit. Der lineare Zusammenhang belegt das zufällige Migrationsverhalten der IEL ( $n=10$  Mäuse,  $n=52$  intraepitheliale Lymphozyten). Die zunehmende statistische Schwankung über die Zeit ist in einer geringeren Anzahl einzelner, in die Analyse eingehender Migrationspfade begründet.

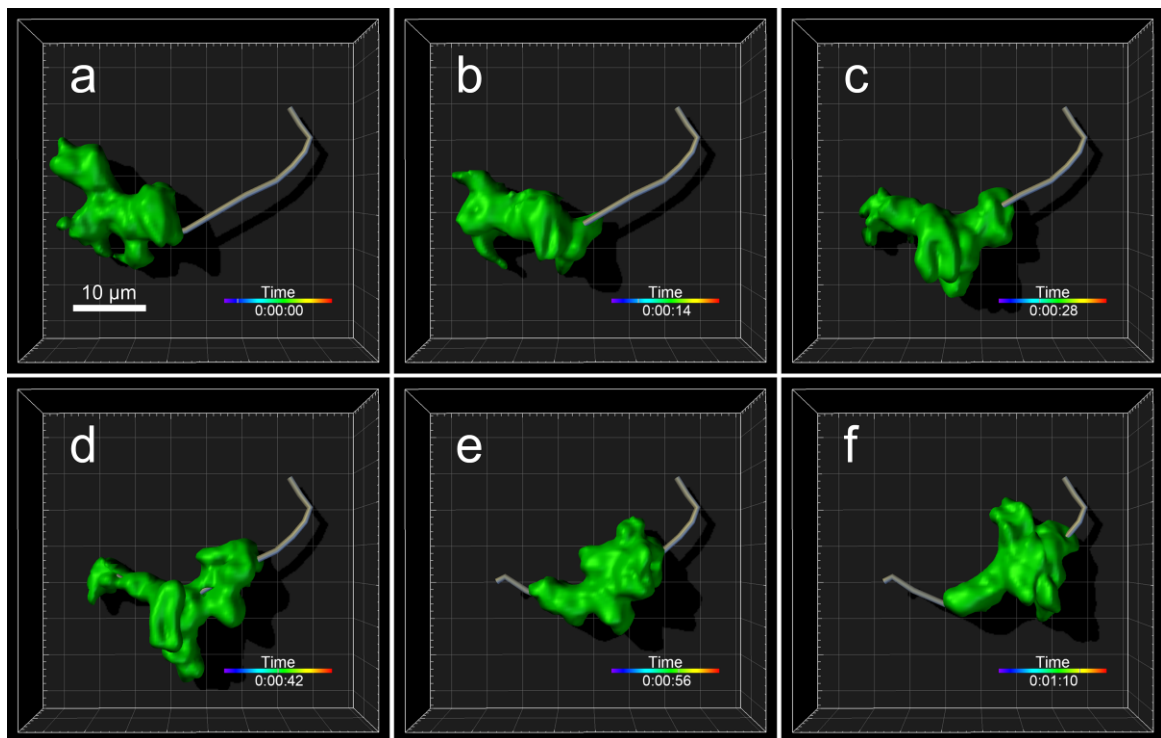
Obwohl sich die Migration einzelner intraepithelialer Lymphozyten als Zufallsbewegung darstellt, ist ihr allgemeines Migrationsverhalten unter Vernachlässigung der absoluten Position im basalen Epithel annähernd vorhersagbar. So repräsentiert der Anstieg des linearen Graphen den Motilitätskoeffizienten  $M$ , der sich aus dem Verhältnis des Quadrats der mittleren Abweichung zum Produkt von  $P_i$  und der Zeit  $t$  ergibt und als Fläche pro Zeit ein Maß für die Beweglichkeit eines verfolgten Zelltyps darstellt (SUMEN ET AL., 2004; BELTMAN ET AL., 2009). Der Motilitätskoeffizient  $M$  lässt sich, analog zum Diffusionskoeffizient, aus der in einer bestimmten Zeit zurückgelegten Abweichung von einem initialen Startpunkt ermitteln und beträgt für intraepitheliale Lymphozyten rund  $61 \mu\text{m}^2/\text{min}$ . Somit ergibt sich theoretisch eine mittlere Abweichung der IEL von  $10 \mu\text{m}$  in 32 sec,  $100 \mu\text{m}$  in 53 min und  $1 \text{ mm}$  in 87 h.

Sowohl die qualitativen wie auch die quantitativen Analysen belegen somit das zufällige Bewegungsmuster der IEL durch das intestinale Epithel. Signifikante Unterschiede im Migrationsverhalten in Abhängigkeit der Lage einer Zotte sowie der Beatmung der Maus konnten dabei nicht festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.2 Zell-Zell-Interaktionen markierter Lymphozyten

Mithilfe der hochauflösenden, Autofluoreszenz-basierten Zwei-Photonen-Mikroskopie konnte das Migrationsverhalten der intraepithelialen Lymphozyten im intestinalen Zottenepithel für große Lymphozytenzahlen untersucht und deren Bewegungsmuster anhand verschiedener Parameter analysiert werden (siehe S. 77). Interaktionen und Kontakte mit dem umliegenden Gewebe konnten aufgrund der weitgehend fehlenden Autofluoreszenz der IEL jedoch nicht im Detail verfolgt und quantifiziert werden. Für weiterführende Untersuchungen ihrer Einzelzell-Dynamik wurden intraepitheliale Lymphozyten daher mit einem luminal applizierten  $\text{CD103}^+$ -FITC Antikörper *in vivo* markiert. Durch die Markierung der äußeren Membran konnten die Umrisse einzelner intraepithelialer Lymphozyten sichtbar gemacht, Membranausstülpungen und damit einhergehende Formveränderungen dreidimensional visualisiert und die Migration präziser verfolgt werden. Die Kombination der Zwei-Photonen-induzierten Autofluoreszenz mit diesem exogenen, für die Zellmembran der IEL spezifischen Fluoreszenzfarbstoff ermöglichte die Quantifizierung von Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakten sowie der Interaktionen mit der angrenzenden Lamina propria, und lieferte zusätzliche Informationen über die amöboide Wanderung der intraepithelialen Lymphozyten.

Durch die Aufzeichnung ihres Volumens mit hoher zeitlicher Auflösung konnte das kriechende Bewegungsmuster einzelner IEL detailliert visualisiert und deren amöbenähnliche Verformung räumlich dargestellt werden. Unter Ausbildung von Lamellopodien am vorderen Zellpol sowie eines Uropods am hinteren Zellpol migrieren die polarisierten, länglichen Lymphozyten durch das Epithel, schieben ihr Zytoplasma in Migrationsrichtung nach vorn und ziehen ihr hinteres Ende fortlaufend nach. Durch diesen immer wiederkehrenden Kontraktions-Retraktions-Zyklus bewegen sich die IEL kontinuierlich durch das basale Zottenepithel (Abbildung 4.24 und Movie 4.24).



**Abbildung 4.24. Movie 4.24** Amöboide Gestaltänderungen eines CD103<sup>+</sup>-markierten IEL während seiner Migration durch das Zottenepithel (nicht dargestellt) über einen Beobachtungszeitraum von 1 min 10 sec. Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 755$  nm, Bildausschnitt 44  $\mu\text{m}$  x 41  $\mu\text{m}$ , zeitliche Auflösung 14 sec. Durch die spezifische Markierung der Zellmembran des intraepithelialen Lymphozyts mit dem luminal applizierten CD103<sup>+</sup>-FITC Antikörper wird dessen kriechende Wanderungsbewegung unter ständig wechselnder, amöbenähnlicher Verformung seines Volumens vierdimensional verfolgbar (**a-f**).

#### 4.3.2.1 Migrationsverhalten CD103<sup>+</sup>-FITC-markierter IEL

Um einen Einfluss der Markierung auf die Zelldynamik und Vitalität ausschließen zu können, wurde zunächst das Migrationsverhalten der CD103<sup>+</sup>-FITC-markierten intraepithelialen Lymphozyten im Zottenepithel analysiert und mit dem der unmarkierten verglichen.

Während sich unmarkierte IEL innerhalb des Epithels nur begrenzt auflösen lassen, erscheinen die Farbstoff-markierten Lymphozyten im epithelialen Zellverband scharf konturiert. Ähnlich der Auswertung unmarkierter IEL wurden verschiedene Bewegungsparameter einzelner CD103<sup>+</sup> Lymphozyten anhand der Raumkoordinaten ihres Masseschwerpunktes bestimmt. Die mittlere momentane Geschwindigkeit der vitalen, sich dynamisch durch das Epithel bewegend CD103<sup>+</sup>-markierten IEL innerhalb der ersten 30 Zeitpunkte der Aufzeichnung beträgt durchschnittlich 11,3  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 5,2 \mu\text{m}/\text{min}$ ), und liegt somit signifikant ( $p < 0,001$ ) über der unmarkierter IEL (vgl. 10,0  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) ( $n=8$  Mäuse,  $n=668$  intraepitheliale Lymphozyten). Während 1,44% der mittleren momentanen Geschwindigkeiten unter 2  $\mu\text{m}/\text{min}$  liegen ( $n=82$ ), zeigen sich 1,47% der Werte größer als 25  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $n=84$ ). Die ermittelte Maximalgeschwindigkeit von einem Zeitpunkt zum nächsten beträgt dabei 36,2  $\mu\text{m}/\text{min}$  und zeigt ebenfalls einen deutlichen Unterschied zur Maximalgeschwindigkeit unmarkierter intraepithelialer Lymphozyten ( $n=5697$ ).

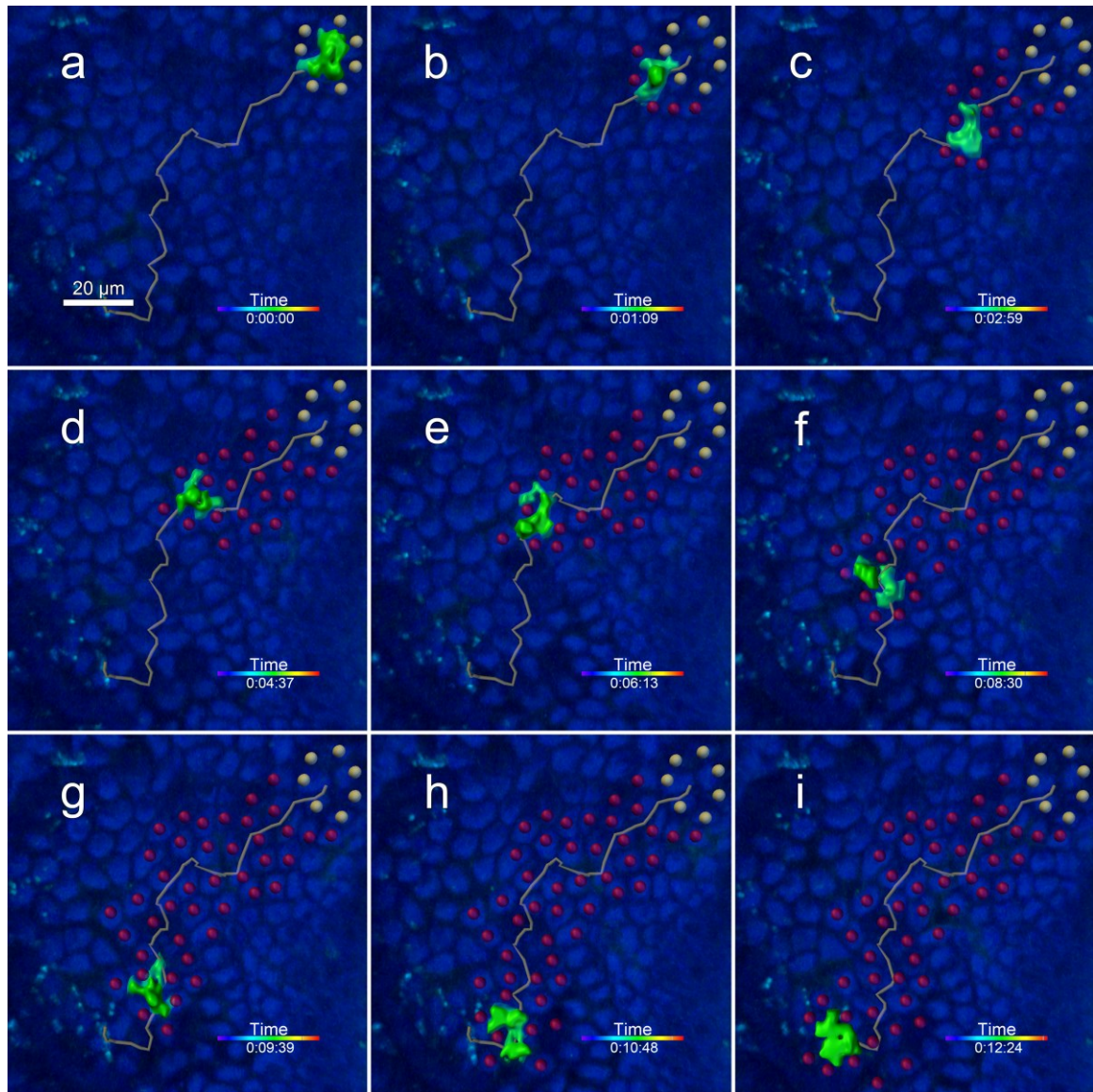
Um die Quantifizierung einer Subpopulation von intraepithelialen Lymphozyten oder aber womöglich ein verändertes Migrationsmuster infolge induzierter Epithelschäden während der experimentellen Bedingungen auszuschließen, wurden neben der Einzelzell-Geschwindigkeit CD103<sup>+</sup>-FITC-markierter IEL zusätzlich Entfernungsrates und Abweichungsindex bestimmt. Während auch die Einzelzell-Geschwindigkeit markierter IEL starken Schwankungen unterliegt und Werte zwischen 5,7  $\mu\text{m}/\text{min}$  und 20,5  $\mu\text{m}/\text{min}$  annimmt ( $n=90$  intraepitheliale Lymphozyten), wandern die CD103<sup>+</sup> IEL innerhalb der ersten 25–30 Zeitpunkte im Mittel 81,8  $\mu\text{m}$  ( $SD \pm 24,2 \mu\text{m}$ ) weit und unterscheiden sich in Bezug zur Wegstrecke der zurückgelegten Entfernung somit kaum von unmarkierten IEL ( $n=36$  intraepitheliale Lymphozyten). Auch die ermittelte Entfernungsrates sowie der Abweichungsindex sind nahezu identisch. So bewegen sich die, über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 40 Zeitpunkten analysierten, CD103<sup>+</sup> IEL mit einer durchschnittlichen Entfernungsrates von 2,9  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $SD \pm 2,3 \mu\text{m}/\text{min}$ ) vom Ausgangs- hin zum Endpunkt ihrer Migration (vgl. 3,1  $\mu\text{m}/\text{min}$  bei unmarkierten IEL) und zeigen dabei ebenfalls ein, mit einem mittleren Abweichungsindex von 0,32 ( $SD \pm 0,20$ ) quantitativ belegtes, ungerichtetes Zufallsmuster (vgl. 0,35 bei unmarkierten IEL) ( $n=39$  intraepitheliale Lymphozyten). Anhand der deutlichen Übereinstimmung des quantifizierten Migrationsmusters CD103<sup>+</sup>-markierter IEL mit dem unmarkierter intraepithelialer Lymphozyten kann ein Markierungs-induzierter Einfluss auf das Migrationsverhalten somit ausgeschlossen werden.

#### 4.3.2.2 Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte

Wie die Farbstoff-basierte Visualisierung ihrer Wanderungsbewegung zeigt, bewegen sich CD103<sup>+</sup> IEL mit vergleichsweise hoher Geschwindigkeit amöbenähnlich durch das Zottenepithel und kontaktieren dabei kontinuierlich umliegende Epithelzellen. Infolge der Zellmembran-Markierung CD103<sup>+</sup> IEL sowie des spektral getrennt detektierten Autofluoreszenz-Signals der Enterozyten konnten auftretende Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte identifiziert und deren Dauer quantifiziert werden. Im statischen Zustand, zu einem einzelnen Zeitpunkt, berühren die IEL mit ihren kegelförmigen Ausstülpungen und zellulären Fortsätzen rund 6,9 ( $SD \pm 1,0$ ) benachbarte Epithelzellen (n=8 Mäuse, n=118 intraepitheliale Lymphozyten). Während ihrer Wanderung durch den basalen Zellzwischenraum kontaktieren die IEL pro Minute durchschnittlich 4,1 ( $SD \pm 1,2$ ) neue Epithelzellen (n=8 Mäuse, n=110 intraepitheliale Lymphozyten), wobei die Kontaktzeit zwischen einem IEL und einer Epithelzelle dabei im Mittel 2 min 31 sec ( $SD \pm 56$  sec) beträgt (n=19 intraepitheliale Lymphozyten, n=91 Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte). Obwohl auch deutlich längere Kontaktzeiten von bis zu 5 min 21 sec ermittelt wurden, zeigt sich der Großteil der beobachteten Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte transient und somit von eher kurzer Dauer (Abbildung 4.25 und Movie 4.25).

Die Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte finden vorwiegend basal, unterhalb der Zellkernebene der Enterozyten statt. Vereinzelt erstrecken sich die Farbstoffmarkierten Fortsätze auch deutlich über die Zellkernebene nach apikal. Übereinstimmend mit den Beobachtungen unmarkierter IEL konnten jedoch auch hier keine ins Darmlumen ragenden Fortsätze identifiziert werden (n=66 4D-Datensätze, n=696 intraepitheliale Lymphozyten).





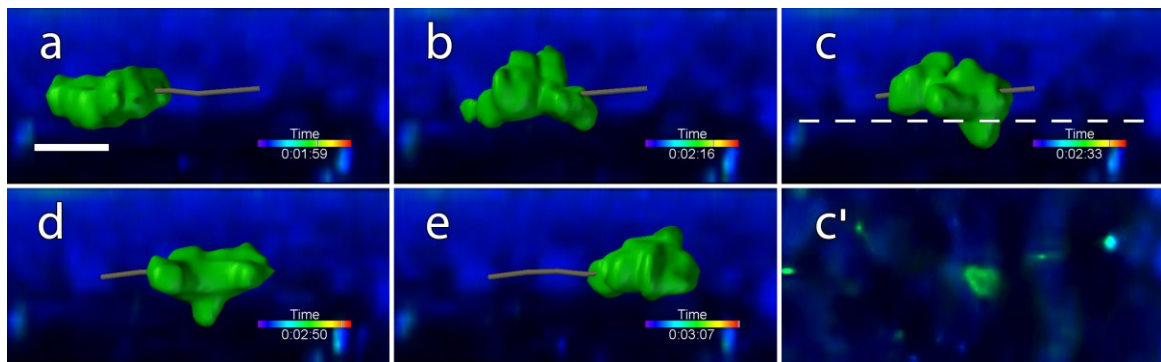
**Abbildung 4.25. Movie 4.25** Lymphozyt-Epithelzell-Membrankontakte über eine Beobachtungszeit von 12 min 24 sec. Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 755 \text{ nm}$ , Bildausschnitt  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ , zeitliche Auflösung 14 sec. Der IEL wurde mit  $\text{CD103}^+$ -FITC markiert und ist als grünes 3D-Objekt dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung wurde der Autofluoreszenz der Epithelzellen die Falschfarbe blau zugeordnet (**a-i**). Im statischen Zustand berührt der intraepitheliale Lymphozyt 7 umliegende Epithelzellen (hellbraune Punkte). Während seiner amöbenähnlichen Migration durch das Epithel kontaktiert der IEL fortlaufend neue Epithelzellen (rote Punkte). Die Dauer der transienten Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte beträgt dabei im Mittel 2 min 31 sec ( $SD \pm 56 \text{ sec}$ ) ( $n=19$  intraepitheliale Lymphozyten,  $n=91$  Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte).

#### 4.3.2.3 Interaktionen mit der angrenzenden Lamina propria

Die durch das intestinale Zottenepithel patrouillierenden  $\text{CD103}^+$  IEL treten während ihrer Migration jedoch nicht nur mit benachbarten Epithelzellen in Kontakt. So konnten auch

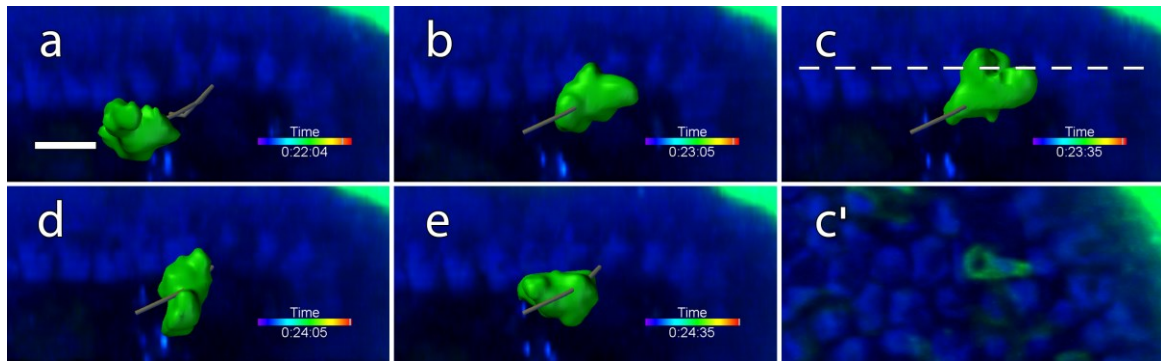
Kontakte intraepithelialer Lymphozyten mit Komponenten der angrenzenden Lamina propria beobachtet werden. Darüber hinaus konnten Fortsätze CD103<sup>+</sup>-markierter IEL aus der Lamina propria im Epithel detektiert und Zelldurchtritte durch die Basalmembran des Epithels von einem Kompartiment in das andere verfolgt und quantifiziert werden.

Für die intraepitheliale Migration sind kontinuierliche Verformungen notwendig. Wie die Analyse der Einzelzell-Dynamik zeigt, ragen intraepitheliale Lymphozyten während ihrer amöboiden Wanderung durch das basale Epithel mit ihren länglichen Fortsätzen nicht nur in umliegende Zellzwischenräume, sondern teils auch durch Öffnungen der Basalmembran hindurch in die darunter liegende Lamina propria (Abbildung 4.26). Die Verweilzeit der zellulären Fortsätze aus dem Epithel in die Lamina propria beträgt dabei im Mittel 42 sec, variiert jedoch in Abhängigkeit der zeitlichen Auflösung zwischen 13 sec und 2 min 31 sec (n=243 Ereignisse).



**Abbildung 4.26** Seitenansicht eines CD103<sup>+</sup>-markierten IEL (grün) während seiner Migration durch das intestinale Zottenepithel (blau) (a-e). 3D-Darstellung. Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex} = 755 \text{ nm} + 930 \text{ nm}$ , zeitliche Auflösung 17 sec. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . Der IEL streckt über 2 Zeitpunkte (34 sec) einen Fortsatz durch die Basalmembran in die darunter liegende Lamina propria (c, d). (c') zeigt einen optischen Transversalschnitt durch die Lamina propria knapp unterhalb der Basalmembran zum Zeitpunkt c (gestrichelte Linie). Der angeschnittene, in die Lamina propria ragende Fortsatz besitzt einen Durchmesser von 4–5  $\mu\text{m}$ .

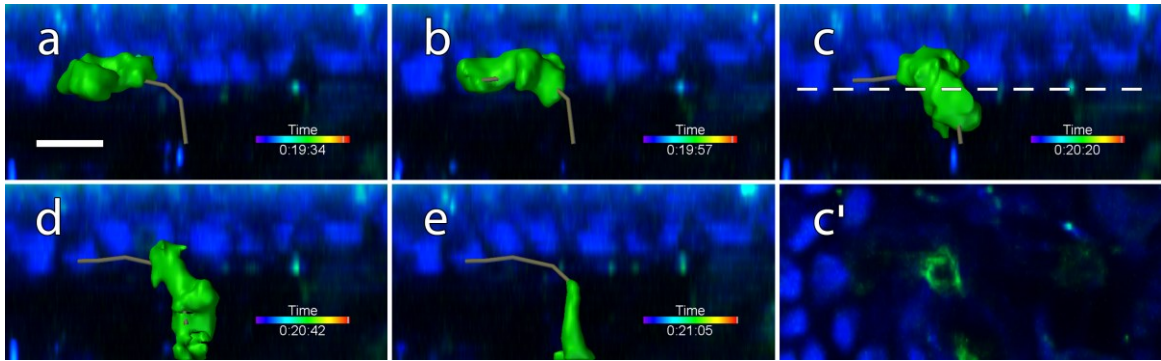
Neben CD103<sup>+</sup> IEL im basalen Epithel konnten markierte Lymphozyten ebenso innerhalb der Lamina propria identifiziert, leuchtend helle Zellfortsätze aus dem Schleimhautbindegewebe im Epithel detektiert und deren Verweilzeit im epithelialen Interzellularraum quantifiziert werden (Abbildung 4.27). Die Dauer der länglichen Fortsätze im basale Epithel beträgt im Mittel 1 min 9 sec, wobei die Verweilzeit mit Werten zwischen 16 sec und 3 min 17 sec ebenfalls stark variiert (n=30 Ereignisse).



**Abbildung 4.27** Seitenansicht eines CD103<sup>+</sup>-markierten Lymphozyten (grün) knapp unterhalb der Basalmembran (**a-e**). 3D-Darstellung. Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 755 \text{ nm} + 930 \text{ nm}$ , zeitliche Auflösung 30 sec. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . Während seiner Wanderung durch die Lamina propria ragt der Lymphozyt über 3 Zeitpunkte (1 min 30 sec) mit einem Fortsatz durch die Basalmembran in den epithelialen Zellzwischenraum (**b-d**). (**c'**) zeigt einen optischen Schnitt durch das Zottenepithel (blau) knapp oberhalb der Basalmembran zum Zeitpunkt c (gestrichelte Linie). Der angeschnittene, in das Epithel ragende Fortsatz besitzt auf Höhe der Basalmembran einen Durchmesser von 4–5  $\mu\text{m}$ .

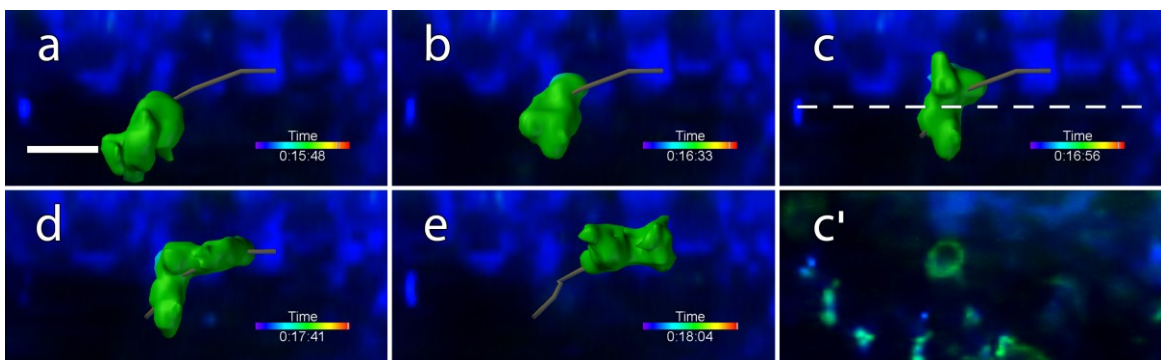
Zusätzlich zu einzelnen Fortsätzen und länglichen Ausstülpungen durch die Basalmembran wurden auch ganze Zelldurchtritte von einem in das angrenzende Kompartiment aufgezeichnet. Bemühungen, die Basalmembran mithilfe spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe *in vivo* anzufärben und darzustellen, blieben erfolglos. Übereinstimmend mit dem Durchmesser Membran-markierter Zellfortsätze auf Höhe der Basalmembran zeigen sich die Durchtrittsstellen im optischen Transversalschnitt jedoch ebenso als 4–5  $\mu\text{m}$  breite Poren innerhalb der dünnen Kollagenschicht. Um sich durch die Öffnungen der Basalmembran drängen zu können, müssen sich die IEL daher sanduhrartig verformen. Die Dauer der Durchtritte aus dem Epithel in die Lamina propria (Abbildung 4.28) ist dabei nahezu identisch mit der von Durchritten in umgekehrter Richtung (Abbildung 4.29). So beträgt die Zeit beim Durchtritt intraepithelialer Lymphozyten aus dem Epithel in die Lamina propria im Mittel 1 min 23 sec ( $n=65$  Ereignisse), die Dauer der Durchtritte in das Epithel durchschnittlich 1 min 30 sec ( $n=49$  Ereignisse). Mit Werten von 32 sec bis 2 min 50 sec beim Eintritt intraepithelialer Lymphozyten in das Schleimhautbindegewebe sowie 41 sec bis 2 min 33 sec beim Übergang aus der Lamina propria in das Epithel unterliegen jedoch auch die quantifizierte Durchtrittszeiten einer hohen zeitlichen Variabilität.





**Abbildung 4.28** Seitenansicht eines CD103<sup>+</sup>-markierten IEL (grün) während seines Durchtritts aus dem Epithel (blau) in die Lamina propria (**a-e**). 3D-Darstellung. Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 755 \text{ nm} + 930 \text{ nm}$ , zeitliche Auflösung 23 sec. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . (**c'**) zeigt einen optischen Schnitt durch das Schleimhautbindegewebe knapp unterhalb der Basalmembran zum Zeitpunkt c (gestrichelte Linie). Der angeschnittene Durchmesser des IEL auf Höhe der Basalmembran ist über 3 Zeitpunkte (1 min 8 sec) sichtbar und beträgt 4–5  $\mu\text{m}$ .

In jeder der Fluoreszenzfarbstoff-basierten, unter physiologischen Bedingungen aufgenommenen 3D-Zeitserien konnten zelluläre Fortsätze und Durchtritte markierter, CD103<sup>+</sup> IEL durch die Basalmembran beobachtet werden (n=7 Mäuse, n=62 4D-Datensätze). Aus den insgesamt 378 in die quantitative Auswertung einbezogenen Ereignissen ergibt sich ein prozentuales Verhältnis der Anzahl Fortsätze aus dem Epithel in die Lamina propria zur Anzahl Fortsätze aus der Lamina propria in das Epithel von 89% zu 11%. Zwischen den, innerhalb der Bildfelder aufgezeichneten Zelldurchtritten von einem in das andere Kompartiment ergibt sich ein Verhältnis von 57% zu 43%, wobei die Häufigkeit der Zelldurchtritte intraepithelialer Lymphozyten aus dem Epithel in das Schleimhautbindegewebe dabei leicht überwiegt.



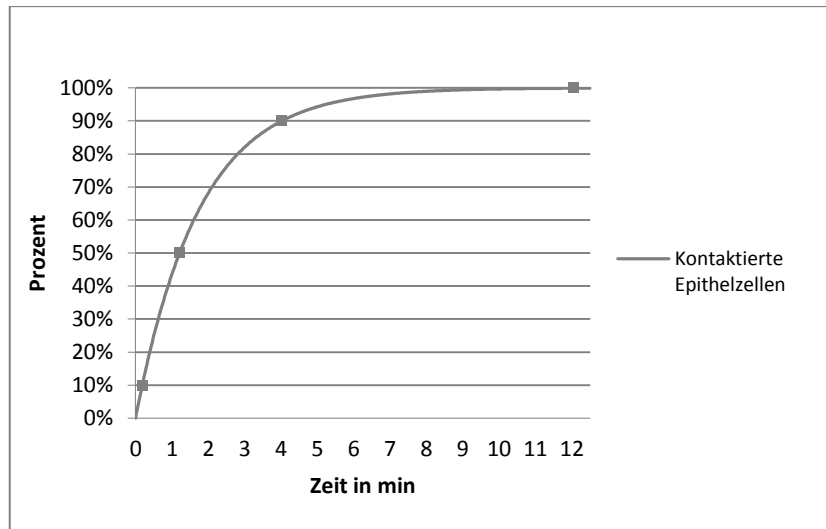
**Abbildung 4.29** Seitenansicht eines CD103<sup>+</sup>-markierten Lymphozyten (grün) während seines Durchtritts aus der Lamina propria in das Epithel (blau) (**a-e**). Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 755 \text{ nm} + 930 \text{ nm}$ , zeitliche Auflösung 23 sec. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . (**c'**) zeigt einen optischen Transversalschnitt durch die Lamina propria knapp

unterhalb der Basalmembran zum Zeitpunkt c (gestrichelte Linie). Der abgebildete Durchmesser des IEL auf Höhe der Basalmembran beträgt 4–5  $\mu\text{m}$  und ist über 5 aufeinander folgende Zeitpunkte (1 min 53 sec) sichtbar.

#### **4.4 Kontakthäufigkeit zwischen Lymphozyten und Epithelzellen**

Intraepitheliale Lymphozyten zeigen ein bemerkenswertes Migrationsverhalten. In ihrer Anzahl den Epithelzellen deutlich unterlegen, patrouillieren die IEL unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich durch den Epithelverband und überwachen so dessen Integrität über die gesamte Dünndarmschleimhaut hinweg. Um letztlich quantitative Aussagen über die Effektivität ihrer immunologischen Epithelzellüberwachung treffen zu können, wurde anhand der ermittelten *in vivo* Daten abschließend ein mathematisches Modell zur Kontakthäufigkeit zwischen den intraepithelialen Lymphozyten und Epithelzellen etabliert.

In Abhängigkeit der quantifizierten Einzelzell-Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten, der Häufigkeit ihrer Epithelzell-Membrankontakte ( $4,1 \pm 1,2 \text{ pro min}$ ) sowie des numerischen Verhältnisses von IEL zu Epithelzellen ( $7,2 \pm 1,4$ ) konnte der Anteil statistisch neu kontaktierter Epithelzellen pro Lymphozyt und Zeit berechnet werden. Demnach wird eine individuelle Epithelzelle durchschnittlich alle 73 sec von mindestens einem IEL kontaktiert. Bezogen auf den gesamten Zellverband werden 90% der Epithelzellen innerhalb von rund 4 min, 99% der Epithelzellen innerhalb von 8 min 3 sec, und 99,9% aller intestinalen Epithelzellen innerhalb von etwa 12 min mindestens einmal durch intraepitheliale Lymphozyten kontaktiert (Abbildung 4.30). Wie die Berechnungen der Kontakthäufigkeit zwischen Lymphozyten und Epithelzellen zeigen, ermöglicht die Dynamik der IEL somit eine kontinuierliche, flächendeckende Überwachung des Dünndarmepithels sowie eine immunologische Überprüfung der epithelialen Integrität in äußerst kurzen Zeitabständen.



**Abbildung 4.30** Kontakthäufigkeit zwischen intraepithelialen Lymphozyten und den Epithelzellen. Der Anteil neu kontaktierter Epithelzellen pro Lymphozyt und Zeit kann von der Einzelzell-Geschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten, der ermittelten Häufigkeit der Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte und vom numerischen Verhältnis der IEL zu Epithelzellen abgeleitet werden. Eine individuelle Epithelzelle wird im Mittel alle 73 sec von einem intraepithelialen Lymphozyten kontaktiert. Ferner ergeben die Berechnungen, dass 99,9% aller intestinalen Epithelzellen innerhalb von rund 12 min von mindestens einem IEL kontaktiert werden.

## 5 Diskussion

Die Dünndarmschleimhaut ist auf die Erfüllung verschiedener funktioneller Anforderungen ausgelegt. Neben einer effizienten Verdauung und Resorption von Nahrungsbestandteilen kommt der intestinalen Schleimhaut aufgrund ihrer enormen Oberfläche sowie exponierten Lage zur Außenwelt eine ebenso essentielle Bedeutung in der Abwehr von potenziellen Krankheitserregern und anderen Noxen zu (MOWAT UND AGACE, 2014). Zwischen den Epithelzellen in der zellulären Grenzschicht lokalisiert, stellen die IEL eine der ersten Verteidigungslinien der mukosalen Immunabwehr gegenüber dem Darmlumen dar. Durch das Erkennen und Beseitigen geschädigter, entarteter oder infizierter Epithelzellen gewährleisten die intraepithelialen Lymphozyten die Aufrechterhaltung und Sicherstellung der Gewebshomöostase sowie der epithelialen Barrierefunktion. Trotz ihrer diffusen Verteilung im Dünndarmepithel den Enterozyten zahlenmäßig unterlegen, sind die Mechanismen ihrer immunologischen Überwachung und intravitalen Interaktionen mit den residenten Epithelzellen noch immer weitgehend ungeklärt (ISHIKAWA ET AL., 2007; CHEROUTRE ET AL., 2011; KONJAR ET AL., 2017).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die intakte Dünndarmschleimhaut lebender, anästhesierter Mäuse mithilfe der hochauflösenden Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie untersucht, das Migrationsverhalten der IEL im Zottenepithel unter physiologischen sowie hypoxämischen Bedingungen *in vivo* charakterisiert und neue Einblicke in die Dynamik der immunologischen Epithelzellüberwachung an der größten Oberfläche des Organismus gewährt. Morphometrische Untersuchungen zum Ausmaß der Vergrößerung der Schleimhautoberfläche erlaubten letztlich die Übertragung der *in vivo* quantifizierten Zellzahlen und Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte auf den gesamten Dünndarm.

### 5.1 Oberflächenvergrößerung der Dünndarmschleimhaut

Die Vergrößerung der inneren Oberfläche des Dünndarms beruht vor allem auf dem Vorhandensein blatt- bis fingerförmiger Zotten sowie apikaler Mikrovilli auf den Epithelzellen (TRIER UND MADARA, 1981). Jedoch weisen diese strukturellen Spezialisierungen neben spezies- und abschnittsspezifischen Unterschieden auch eine große Variabilität unter normalen, pathologischen und experimentellen Zuständen auf (MAYHEW UND MIDDLETON,

1985). Obwohl deskriptive histologische und morphometrische Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen bereits das Verständnis der Architektur sowie funktionellen Anpassung der Dünndarmschleimhaut der Maus erleichterten, sind quantitative Angaben über die Dimensionen ihrer intestinalen Resorptions- und damit luminalen Angriffsfläche unter physiologischen Bedingungen bislang nur ungenügend vorhanden (SMITH ET AL., 1984; CASTELEYN ET AL., 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte, unter Berücksichtigung abschnittsspezifischer Unterschiede in der Anzahl und Geometrie intestinaler Zotten und Mikrovilli, die Vergrößerung der absoluten Fläche der murinen Dünndarmschleimhaut licht- und elektronenmikroskopisch auf rund  $0,46 \text{ m}^2$  quantifiziert werden. Mithilfe geometrischer Modelle wurde die Oberfläche der Zotten und Mikrovilli in verschiedenen Darmabschnitten mathematisch bestimmt und, ausgehend von einem planen Darmrohr und den stereologisch erhobenen Daten, auf den resultierenden Vergrößerungsfaktor geschlossen.

Obwohl sich die charakteristische Morphologie der Schleimhaut gleichmäßig über den gesamten Dünndarm erstreckt (NEUTRA, 1988), unterschieden sich die regelmäßig angeordneten Zotten innerhalb der untersuchten Darmabschnitte in Bezug auf ihre Anzahl und Geometrie signifikant voneinander. So nimmt die Dichte der Zotten vom duodeno-jejunalen zum jejuno-ilealen Übergang zu, ist im terminalen Ileum verglichen zum Jejunum jedoch deutlich erniedrigt. Die numerischen Unterschiede gingen mit einer abschnittsspezifischen Morphologie der basalen Querschnittsfläche einher, wobei die Zotten im jejuno-ilealen Übergang den geringsten Umfang sowie Maximal- und Querdurchmesser aufwiesen. Aufgrund der ermittelten, in der Literatur allgemein gültigen Abnahme der Zottenhöhe von oral nach aboral (TRIER UND MADARA, 1981; NEUTRA, 1988) zeigte sich im duodeno-jejunalen Darmabschnitt die größte, bedingt durch die signifikant niedrigere Zottenhöhe im terminalen Ileum dagegen die geringste Zottenoberfläche. Mit zunehmender Entfernung vom Magenausgang verringert sich daher der resultierende Vergrößerungsfaktor der Schleimhaut durch Zotten und somit deren Kontaktfläche zum Darmlumen.

Das Vorhandensein von Mikrovilli auf den Epithelzellen führte nochmals zu einer erheblichen, zusammen mit den Zotten insgesamt etwa 150-fachen Vergrößerung der Schleimhautoberfläche. Während sich die Dichte der stäbchenförmigen, parallel angeordneten Mikrovilli innerhalb der untersuchten Darmabschnitte kaum unterschied, variierte deren Höhe und damit Oberfläche entlang der apiko-basalen Zottenachse signifikant. Die Oberfläche der Schleimhaut verringert sich daher nicht nur in Längsachse des Dünndarms, sondern – bedingt durch die unterschiedliche Morphologie der Mikrovilli – ebenso entlang



einzelner Zotten von apikal nach basal. Eine, mit der Höhe graduell ansteigende Flächen-dichte der Mikrovilli in Richtung Zottenspitze konnte, anders als publiziert (ABBAS ET AL., 1989; CASTELEYN ET AL., 2010), aufgrund zu geringer Probenumfänge entlang individueller Zotten nicht sicher bestätigt werden.

Da der resultierende Gesamt-Vergrößerungsfaktor die abschnittsspezifische Oberfläche der Zotten und Mikrovilli in Abhängigkeit von deren Höhe und Querschnitt einbezieht, konnte die absolute Fläche der murinen Dünndarmschleimhaut unter Berücksichtigung der speziellen Morphologie quantifiziert werden. Allerdings basieren die Berechnungen der Zotten- und Mikrovilli-Oberflächen auf vereinheitlichten geometrischen Modellen, was auf eine lediglich mathematische Annäherung an die tatsächliche Schleimhautoberfläche *in vivo* hindeutet (KOMURO ET AL., 1994). Dagegen spricht der methodische Ansatz mit exakter Bestimmung einzelner, in die Auswertung einbezogener stereologischer Parameter. So ermöglichte die manuelle Markierung der basalen, stark von der Kreisform abweichenden Querschnittsflächen der Zotten eine präzise, rechenfreie Ermittlung deren Umfänge sowie Maximal- und Querdurchmesser.

Im Vergleich zu vereinfachten Modellen bisheriger Studien (BARRY, 1976; MAYHEW, 1984; LANGENBECK, 1996; SETTY ET AL., 2011) ergab das verwendete geometrische Modell mit elliptischem Zylinder und einem halbierten, triaxialen Ellipsoid als Zottenspitze daher durchaus realistische Werte der Zottenoberfläche. Auch das geometrische Modell der Mikrovilli mit gleichförmigem Zylinder und Halbkugel als apikale Kappe erlaubte eine, trotz Vereinheitlichung durch die Verwendung der gemittelten Höhe, aussagekräftige, mit den Werten der Literatur (CASTELEYN ET AL., 2010) vergleichbare Bestimmung der mittleren Oberfläche intestinaler Mikrovilli. Da histologische Aufbereitungen jedoch mit einer unvermeidlichen Schrumpfung der entnommenen Gewebeproben einhergehen, ist ein Unterschätzen der stereologischen Parameter und daraus berechneten Zotten- und Mikrovilli-Oberflächen selbst bei frisch fixiertem Gewebe wahrscheinlich. Durch Untersuchungen unfixierter Proben könnte der Einfluss der Schrumpfung quantifiziert, die Morphometrie mit den bereits ermittelten Werten verglichen und deren Verhältnis als Korrekturfaktor nachträglich einberechnet werden. So ließen sich methodisch bedingte Meßartefakte korrigieren und die Oberflächenberechnungen den *in vivo* vorliegenden Dimensionen anpassen.

Obwohl sich der Gesamt-Vergrößerungsfaktor der Schleimhaut von der Flächen-dichte, der mittleren Oberfläche der Zotten und Mikrovilli sowie der Zotten- und Mikrovilli-freien Fläche zwischen deren Basen ableitet, erlaubt die mathematische Extrapolation

auf den gesamten Dünndarm dennoch allein approximative Aussagen über die absolute Oberfläche. So wurden einzelne strukturelle Spezialisierungen der Schleimhaut, wie das Vorhandensein vereinzelt vorkommender, Zotten-freier Dom-Areale sowie Mikrovilli-freier Becherzellen (HORIUCHI ET AL., 2005), nicht in die Berechnungen einbezogen. Eine Berücksichtigung der 6–12 regelmäßig über die gesamte Darmlänge der Maus verteilten, je 1,3–3 mm langen Peyer-Plaques (ABE UND ITO, 1977) sowie der ins Epithel eingestreuten, nicht resorbierenden Becherzellen würde die ermittelte Anzahl der Zotten und Mikrovilli pro Dünndarm verringern und die Absolutfläche der Schleimhaut folglich verkleinern. Da nur ein geringer Anteil der Krypten Kontakt zum Darmlumen besitzt, die röhrenförmigen Einsenkungen des Epithels in die Lamina propria zudem hauptsächlich der Sekretion und kontinuierlichen Epithelregeneration dienen (LEWIS UND FORDTRAN, 1975; NEUTRA, 1988), ohne die Resorptionskapazität der Schleimhaut zu erhöhen, kann deren Einfluss auf die Vergrößerung der effektiven Resorptions- sowie Angriffsfläche vernachlässigt werden. Permanente Schleimhautfalten, wie sie u.a. beim Menschen vorkommen, finden sich im Dünndarm der Maus dagegen nicht (TREUTING ET AL., 2017).

Wenngleich die Oberfläche der Dünndarmschleimhaut selbst durch Einflussfaktoren wie dem Körpergewicht, Alter und Geschlecht sowie beim Nahrungsentzug bereits erheblichen strukturellen und funktionellen Anpassungen unterliegt (ROSS UND MAYHEW, 1985; OGIOLDA ET AL., 1998; CASTELEYN ET AL., 2010; WOLCZUK ET AL., 2011), so verändert sich die Anzahl der Zotten pro Dünndarm unter physiologischen Zuständen jedoch kaum (CLARKE, 1972; FORRESTER, 1972). Dennoch stellt vor allem die Flächendichte der Zotten eine der möglichen Fehlerquellen bei der experimentellen Bestimmung und Quantifizierung der absoluten Schleimhautoberfläche dar. In starkem Maße von den angewandten Untersuchungsmethoden abhängig, resultiert eine Fixations-bedingte Schrumpfung des Gewebes zusätzlich in einem Überschätzen der tatsächlichen Flächendichte und somit in einer zu hohen Oberflächenvergrößerung bei relativ geringerer Darmfläche. Hingegen verursacht eine postmortale Dehnung der Darmwand infolge zu hoher Drücke beim Spülen oder zu hohem Zug bei der Längenmessung *ex situ* ein Unterschätzen der Zottendichte und damit womöglich der Gesamt-Oberflächenvergrößerung (LANGENBECK, 1996).

Neben den zugrunde liegenden Rechenmodellen und strukturell-funktionellen Anpassungen der Darmschleimhaut *in vivo* könnten daher ebenso verschiedene Versuchsdurchführungen ein Grund für die erheblichen Abweichungen der Angaben zur Gesamtoberfläche beim Menschen und der Maus in der Literatur sein. Casteleyn et al. postulierten bereits eine absolute Fläche der murinen Dünndarmschleimhaut von 1,34 m<sup>2</sup> (CASTELEYN

ET AL., 2010), was einer Abweichung in dem Ausmaß der Oberflächenvergrößerung um den Faktor 3 entspricht und nicht allein durch die berücksichtigte Schrumpfung begründet werden kann. Während die angegebene mittlere Darmlänge von 43,8 cm als Ausgangswert der Oberflächenbestimmung mit der von mir ermittelten nahezu übereinstimmt, basiert deren Berechnung auf lichtmikroskopischer Ebene allerdings auf der Anwendung stereologischer Zählverfahren und somit auf einer Oberflächenschätzung der einzelnen Darmsegmente. So wurde den histologischen Schnitten ein zyklisches Gitter überlagert und, im Unterschied zur Bestimmung exakter stereologischer Parameter, lediglich das Verhältnis der Anzahl von Schnittpunkten mit der Schleimhautoberfläche zur Anzahl von Gitterpunkten auf dem Gewebe ermittelt (CASTELEYN ET AL., 2010).

Intravitale Quantifizierungen der Gesamtfläche der intestinalen Schleimhaut sind aufgrund des dynamisch peristaltischen Verhaltens des Dünndarms kaum als Alternative zu erachten. Vielmehr könnten durch verifizierte mathematische Modelle sowie standardisierte Untersuchungsmethoden, wie beispielsweise Organentnahmen in Kochsalzlösung oder Längenmessungen unter Bedingungen minimaler artifizieller Dehnung, beschriebene Fehlerquellen beseitigt und auch für die Maus abhängige Einflussfaktoren auf die Oberflächenvergrößerung der Dünndarmschleimhaut systematisch *ex vivo* beschrieben werden. Die vorliegenden Ergebnisse bieten dabei eine repräsentative Ausgangslage zur Beurteilung der speziellen Morphologie unter physiologischen Versuchsbedingungen und können, modifiziert übernommen, als Referenz für den Einfluss von Nahrungsinhaltsstoffen, Toxinen oder chronisch-entzündlichen Prozessen dienen.

## **5.2 *In vivo* Morphologie und zelluläre Dynamik der Dünndarmschleimhaut**

Obwohl die Dünndarmschleimhaut eine Begrenzung zur Außenwelt darstellt, ist sie im Inneren des Körpers lokalisiert und daher für Untersuchungen dynamischer Vorgänge innerhalb der epithelialen Grenzschicht zum Darmlumen nur schwer zugänglich. Bemühungen, den vitalen Epithelverband isoliert zu untersuchen, scheiterten aufgrund des induzierten programmierten Zelltods der intestinalen, von der Basalmembran und Lamina propria losgelösten Epithelzellen (HALL ET AL., 1994; STRATER ET AL., 1995; HOFMANN ET AL., 2007). So basiert das aktuelle Verständnis über intraepitheliale Lymphozyten, deren immunologische Epithelzellüberwachung und Interaktionen mit den residenten Epithelzellen noch immer weitgehend auf isolierten *in vitro* Untersuchungen. Durch das Fehlen von umliegenden Gewebsstrukturen, Blut- und Lymphgefäßen, Nerven sowie der extrazellulären

Matrix lassen sich *ex vivo* gewonnene Erkenntnisse jedoch nicht ohne weiteres auf die tatsächliche *in vivo* Situation übertragen (CALDWELL ET AL., 2001; STOLL ET AL., 2002; VON ANDRIAN, 2002).

Durch das in dieser Arbeit verwendete, in Kombination mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie bereits etablierte *in vivo* Mausmodell (KLINGER ET AL., 2012) konnten die physiologischen Gewebsfunktionen der lebenden Dünndarmschleimhaut aufrechterhalten, und so die komplexe dreidimensionale Morphologie des vitalen Zottenepithels unter Erhalt der Blutversorgung und nervalen Innervation beschrieben sowie die Dynamik der im intakten Zellverband migrierenden IEL im Detail analysiert und quantifiziert werden.

### 5.2.1 Morphologie und Morphometrie des Zottenepithels

Der permanente Kontakt der Dünndarmschleimhaut zu einer Vielzahl von Nahrungsantigenen und luminalen Krankheitserregern erfordert differenzierte Schutz- und immunologische Abwehrmechanismen. So besteht das Epithel der Zotten aus verschiedenen spezialisierten Zelltypen mit unterschiedlicher Gestalt und komplexen zellulären Funktionen. Durch die Laser-induzierte Anregung autofluoreszierender Fluorophore konnten morphologische Charakteristika intestinaler Epithelzellen mit subzellulärer Auflösung und hohem Kontrast erfasst, intraepitheliale Lymphozyten *in vivo* identifiziert und Aussagen über die prozentuale Verteilung einzelner Zelltypen im intakten Zottenepithel getroffen werden. Mithilfe des experimentellen Setups wurden dazu optische Serienschritte in verschiedenen Gewebetiefen aufgezeichnet und, basierend auf der Schleimhautoberfläche sowie der intravital quantifizierten Anzahl der im Epithel befindlichen Zellen, der Gesamtzellstatus des Dünndarmepithels der Maus ermittelt.

Im Gegensatz zum hell leuchtenden Zytoplasma der Enterozyten erschienen Zellorganellen wie der Bürstensaum, die Zellkerne und Zellgrenzen sowie die Schleimgranula der Becher- und Sekretgranula der enteroendokrinen Zellen signalarm und dunkel. Besonders hell fluoreszierende Lysosomen konnten aufgrund ihrer unterschiedlichen Charakteristik und spezifischen Lokalisation vom Autofluoreszenz-Signal der Mitochondrien sowie des Zytoplasmas unterschieden werden. Neben Enterozyten, Becherzellen und EEC konnten so auch intraepitheliale Lymphozyten anhand ihrer dreidimensionalen Morphologie im vitalen Zottenepithel identifiziert und von den Zellen sowie nicht-zellulären Gewebekomponenten der Lamina propria abgegrenzt werden. Die *in vivo* Morphologie des Zottenepithels zeigte dabei eine deutliche Übereinstimmung im histologischen Aufbau verglichen mit den elektronenmikroskopischen Ultradünnschnitten.

Da IEL einen, ihr Volumen größtenteils ausfüllenden, nicht-fluoreszierenden Zellkern sowie ein nur schwach autofluoreszierendes Organellenpaket besitzen (ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2011), konnten die Lymphozyten jedoch lediglich als unregelmäßig geformte, dunkel erscheinende Lücken im basalen, hell leuchtenden Epithelzellverband identifiziert werden. Aussagen über phänotypische Unterschiede innerhalb der spezialisierten Lymphozytenpopulation des epithelialen Zellkompartiments konnten anhand des Autofluoreszenz-Signals nicht getroffen werden. Immunhistochemische Untersuchungen zu IEL im Dünndarmepithel von Balb/c Mäusen belegen allerdings eine erhebliche Heterogenität ihres Phänotyps, wobei  $CD8^+$  T-Lymphozyten mit 80% den Hauptanteil,  $CD4^+$  T- sowie  $CD45^+$  B-Lymphozyten mit jeweils 8% dagegen lediglich kleinere Zellpopulationen im epithelialen Kompartiment darstellen (RESÉNDIZ-ALBOR ET AL., 2005).

Bürstenzellen ließen sich auf Basis der Gewebsautofluoreszenz nicht eindeutig identifizieren. Durch eine intravitale Markierung mit UEA-I-FITC konnten die Mikrovilli der einzeln im Zottenepithel verstreuten Zellen jedoch selektiv markiert und so von umliegenden Epithelzellen unterschieden werden (GEBHARD UND GEBERT, 1999; KLINGER ET AL., 2012). Da die relative Häufigkeit der Bürstenzellen im Dünndarmepithel der Maus dabei insgesamt auf weniger als 0,1% geschätzt wird, diese spezialisierten Epithelzellen zudem rund 10x seltener im Epithel der Zotten als in dem der Peyer-Plaques vorkommen (GEBHARD UND GEBERT, 1999), kann ihre Anzahl bei der Auswertung der prozentualen Verteilung einzelner Zelltypen innerhalb des Zottenepithels allerdings vernachlässigt werden.

Obwohl das numerische Verhältnis der Zelltypen zueinander exakt bestimmt, auf die Oberfläche einzelner Zotten bezogen sowie letztlich auf den gesamten Dünndarm hochgerechnet werden konnte, erlauben die *in vivo* quantifizierten Zellzahlen keine Aussagen über eine variierende Verteilung innerhalb verschiedener Dünndarmabschnitte. Zwar stellten die resorbierenden Enterozyten mit einem Anteil von durchschnittlich 80,6% bei weitem den vorherrschenden Zelltyp im Zottenepithel dar, das quantifizierte Verhältnis zu den Becherzellen und IEL basiert jedoch auf Mittelwerten zufällig ausgewählter Zottenregionen und Darmabschnitte. Während der prozentuale Anteil der Becherzellen an allen Epithelzellen vom Duodenum und Jejunum hin zum Ileum von 4% und 6% auf 12% ansteigt (CHENG UND LEBLOND, 1974b; KIM UND HO, 2010), nimmt die Anzahl der IEL in gleicher Richtung ab (BEAGLEY ET AL., 1995; MOWAT UND AGACE, 2014). Mit einem prozentualen Anteil von 13,0% stimmen die *in vivo* erhobenen Zellzahlen der IEL im Mittel dennoch mit

denen aus der Literatur überein (FERGUSON, 1977; CROWE UND MARSH, 1994). Über diese Arbeiten hinaus konnte erstmals die Gesamtzellzahl der intraepithelialen Lymphozyten mit insgesamt rund  $62,5 \times 10^6$  auf den gesamten Dünndarm einer Maus bezogen werden. Da Enterozyten eine gelegentlich leicht konische Gestalt aufwiesen, bei gleicher Referenzfläche luminal womöglich weniger Zellen gezählt wurden als unterhalb der Zellkernebene im 3D-Bildstapel vorhanden, ist ein geringfügiges Überschätzen des numerischen Verhältnisses der IEL zu Epithelzellen allerdings denkbar.

Wenngleich die ermittelten Zellzahlen einzelnen Dünndarmabschnitten sowie Zottenregionen zugeordnet werden könnten, so ermöglichte der methodische Ansatz mit operativer Freilegung der Dünndarmschleimhaut und Zwei-Photonen-induzierter Anregung endogener Fluorophore doch eine detaillierte Visualisierung und Beschreibung der dreidimensionalen Morphologie des vitalen Zottenepithels unter physiologischen Bedingungen. Neben dem Erhalt der Integrität des epithelialen Zellverbands über die Versuchsdauer hinweg belegten zudem Abbildungsartefakte zirkulierender autofluoreszierender Erythrozyten innerhalb der versorgenden Blutkapillaren der Lamina propria eine intakte Gewebsdurchblutung und Aufrechterhaltung der normalen Gewebsfunktionen unter den experimentellen Versuchsbedingungen. Das, während einer schnellen zeilenweisen Abtastung als schwache Linien parallel zur Scanrichtung beobachtete, zufällige Streifenmuster der Erythrozyten ist bei beeinträchtigter Durchblutung des Gewebes dagegen nicht zu sehen (ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2011). Obwohl die physiologische Abschlüpfung von Epithelzellen ins Lumen nicht direkt erfasst und, zusammen mit der Schleimsekretion der Becherzellen, einzig durch die kontinuierliche Ansammlung von Material im wiederholt gespülten Lumen beobachtet wurde, belegten dennoch auch diese weiterhin stattfindenden Prozesse die Aufrechterhaltung physiologischer Gewebsfunktionen während der *in vivo* Aufzeichnungen.

### 5.2.2 Dynamik intraepithelialer Lymphozyten

Als immunologische Wächter des Epithels gewährleisteten die IEL die effektive Überwachung des epithelialen Zellverbands und erfüllen darüber hinaus bedeutende Effektorfunktionen im Rahmen der adaptiven Immunantwort. Ihr, auch ohne vorherrschende Infektion überwiegend Antigen-erfahrener Phänotyp geht dabei mit zugleich immunoprotektiven wie auch -regulatorischen Eigenschaften einher (CHEROUTRE, 2004). So verhindern die intraepithelialen Lymphozyten den initialen Eintritt ins sowie die Ausbreitung luminaler, invasiver Pathogene im Gewebe, erkennen und beseitigen degenerierte oder virusinfizierte

Zellen und schützen ferner vor lokalen Gewebeschäden infolge überschießender Entzündungsreaktionen (CHEROUTRE ET AL., 2011).

Durch das wiederholte, Zwei-Photonen-basierte Aufzeichnen ein und desselben Gewebevolumens konnte die zugrunde liegende Dynamik der IEL im intakten Zottenepithel visualisiert und deren zufälliges Migrationsverhalten anhand der Raumkoordinaten ihres Zellmittelpunktes *in vivo* verfolgt und quantifiziert werden. Neben dem Bewegungsmuster wurden Parameter wie Geschwindigkeit, Einflussfaktoren auf die Migration sowie Kontaktzeiten mit umliegenden Epithelzellen ermittelt und letztlich Aussagen über die Kontakthäufigkeit zwischen Epithelzellen und den intraepithelialen Lymphozyten innerhalb der lebenden Dünndarmschleimhaut getroffen.

Auf die basale Hälfte des Epithels begrenzt, patrouillierten die IEL kontinuierlich, jedoch unterschiedlich schnell durch den epithelialen Zellzwischenraum der Zotten. So unterschieden sich individuelle IEL in Bezug auf ihre Einzelzell-Geschwindigkeit deutlich voneinander. Da auch die momentanen Geschwindigkeiten individueller intraepithelialer Lymphozyten von einem Zeitpunkt zum nächsten starken Schwankungen unterlagen, die Standardabweichung innerhalb der unimodal symmetrischen Häufigkeitsverteilung aller momentanen Geschwindigkeiten somit bereits auf jede einzelne Zelle zurückzuführen ist, konnte das Vorhandensein mehrerer, unterschiedlich schnell migrierender Lymphozytenpopulationen im epithelialen Zellverband mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden. Allerdings limitierte die zu geringe Autofluoreszenz der IEL, die hohe Zelldichte sowie begrenzte zeitliche und/oder räumliche Auflösung eine Verfolgung einzelner unmarkierter Lymphozyten über längere Zeiträume, sodass erhöhte, das Signal-Rausch-Verhältnis und somit die Bildqualität verbessernde Anregungsleistungen mit einer ebenso gesteigerten phototoxischen Gewebsbelastung einhergingen (HUANG ET AL., 2002; ZIPFEL ET AL., 2003a).

Zu hohe Bestrahlungsintensitäten führten bereits wenige Zeitpunkte nach Beginn der Aufzeichnungen zu einer zumeist kontinuierlichen Abnahme der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit im Bildfeld befindlicher IEL. Da ein wiederholtes Aufzeichnen phototoxisch geschädigter IEL selbst einige Stunden nach der initialen Immobilisierung im intakten Epithel keinen erneuten Anstieg ihrer Motilität zeigte, lässt das unbewegliche, Laser-induzierte Verharren an einer Stelle auf eine irreversible Zellschädigung schließen. Untersuchungen zum Effekt der Bestrahlung vitaler Zellen mit ultra-kurz gepulsten Lasern belegen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als Reaktion auf akkumulierte Lichtintensitäten (TIRLAPUR ET AL., 2001; BAUMGART ET AL., 2009). So induziert ein signifikanter

Anstieg der intrazellulären Konzentration dieser Reaktionsprodukte direkt nach der Bestrahlung oxidativen Stress, schädigt äußere Zellmembran, Zellkern sowie die DNA und führt letztlich zum apoptotischen Zelltod (TIRLAPUR ET AL., 2001). Neben dem sorgfältigen Auswählen der Aufzeichnungsparameter sowie der Verwendung längerer Wellenlängen könnten Anhäufungen von reaktiven Sauerstoffspezies daher womöglich auch durch Zugabe von Antioxidantien reduziert (BAUMGART ET AL., 2009) und so phototoxische Schädigungen der IEL während der Laser-induzierten Aufzeichnungen verringert werden. Ein Einwandern polymorphkerniger Leukozyten, wie es bei Untersuchungen Laser-induzierter Epithelläsionen *in vivo* beschrieben wurde (ORZEKOWSKY-SCHROEDER ET AL., 2014; KLINGER ET AL., 2015), konnte trotz erhöhter Bestrahlungsdichten im intakten Epithel nicht bestätigt werden.

Da auch reduzierte Bestrahlungsintensitäten mit zunehmender Aufzeichnungsdauer zu einer Beeinträchtigung der Migrationsgeschwindigkeit führten, kann die niedrigere durchschnittliche Einzelzell-Geschwindigkeit der IEL über 50 Zeitpunkte verglichen zu der über die ersten 30 Zeitpunkte ebenso auf phototoxische Effekte zurückgeführt werden. Wenngleich der Zusammenhang zwischen Bestrahlungsintensität und der Geschwindigkeitsabnahme intraepithelialer Lymphozyten deutlich korrelierte, so basiert die Quantifizierung jedoch lediglich auf dem Vergleich gemittelter momentaner Anfangs- und Endgeschwindigkeiten einzelner Datensätze und berücksichtigt daher nur bedingt den Einfluss phototoxischer Belastungen auf individuelle IEL. Ein Unterschätzen der Laser-induzierten Wirkung durch einzelne, über die Beobachtungsdauer ins Bildfeld eingewanderte bzw. aus dem bestrahlten Bildfeld in umliegende Epithelbereiche ausgewanderte Lymphozyten ist somit vor allem für Langzeitserien denkbar und könnte die hohe Streuung der Werte bei vergleichbaren Bestrahlungsintensitäten erklären. Infolge der methodisch bedingten Fokussierung des Laserstrahls und des zeilenweisen Abtastens verschiedener Gewebetiefen sind schneller migrierende IEL allerdings einer geringeren Strahlenexposition ausgesetzt als sich langsam bewegende Lymphozyten, wodurch auch die Interpretation des Zusammenhangs zwischen Bestrahlungsintensität und der Einzelzell-Geschwindigkeit durch Artefakte beeinflusst wäre.

Zwar verringerte sich die Geschwindigkeit der IEL auch bei verminderter Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut signifikant, im Gegensatz zum irreversiblen phototoxischen Effekt zeigte der kurzzeitig initiierte Zustand der Hypoxämie jedoch reversible Auswirkungen. So begannen die initial immobilisierten Lymphozyten unmittelbar nach erneutem Anstieg der systemischen Sauerstoffsättigung erneut mit ihrer kontinuierlichen Migration



durch das Epithel. Die spezifische und sofortige Empfindlichkeit der IEL auf eine sich ändernde Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut lässt sich dabei durch eine Beeinflussung des Energiestoffwechsels der Zellen infolge der Änderung des intrazellulären Redox-Zustands begründen (PALERO ET AL., 2011). Obwohl der aktuelle Sauerstoffgehalt im Gewebe nicht ohne weiteres bestimmt werden kann, deutet der Anstieg der Fluoreszenzintensität der Enterozyten unter hypoxämischen Bedingungen auf eine Akkumulierung des, während der Sauerstoffminderversorgung in der Atmungskette weniger oxidierten NADH in den Mitochondrien hin. Ob die durchschnittlich erniedrigte, mittlere momentane Geschwindigkeit der IEL im Anschluss an die Hypoxämie durch eine zu lang andauernde Minderversorgung oder durch phototoxische Effekte verursacht wurde, kann nicht sicher geklärt werden. Durch die Verwendung einer, an die zuführende Mesenterialarterie adaptierten Pulsoxymetrie könnte die Sauerstoffversorgung des untersuchten Darmabschnitts theoretisch noch exakter bestimmt und der Migrationsgeschwindigkeit intraepithelialer Lymphozyten zugeordnet werden.

Auch könnten Messungen des arteriellen Blutdrucks, pH-Werts sowie der Glukosekonzentration im Gewebe Aufschluss über weitere Einflussfaktoren auf die Geschwindigkeit und das Migrationsverhalten der IEL geben. Über den Zusammenhang der mittleren momentanen Geschwindigkeit zur Lokalisation der Zotten in Bezug auf die Peyer-Plaques kann nachfolgend nur spekuliert werden. Morphologisch völlig identisch, könnten Unterschiede in der Dichte oder Typzusammensetzung der Lymphozyten signifikant verschiedene Zellgeschwindigkeiten bedingen. Ebenso könnte eine unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen auf der äußeren Zellmembran Einfluss auf die Geschwindigkeit der IEL innerhalb des Epithels Peyer-Plaques-naher und -ferner Zotten haben. Durch kombinierte Quantifizierungen der Zellzahlen und Bewegungsparameter sowie spezifische Markierungen einzelner Oberflächenmoleküle könnten diese Vermutungen systematisch untersucht werden.

Wenngleich der überwiegende Anteil der IEL einen aktivierten, Antigen-erfahrenen Phänotyp besitzt (CHEROUTRE, 2004), so unterschied sich ihr Bewegungsmuster unter physiologischen Bedingungen doch stark von einer geradlinigen Migration. Eine effektive, chemotaktisch gerichtete Bewegung in eine Vorzugsrichtung würde neben einem gesteigerten Abweichungsindex ebenso deutlich höhere Entfernungsraten und somit Migrationsgeschwindigkeiten nahe der Einzelzell-Geschwindigkeit hin zu einem Attraktor implizieren. Da sich die Bewegungsrichtungen der IEL mit zunehmender Migrationsdauer jedoch zufällig änderten, die mittlere Entfernung der Lymphozyten vom initialen Startpunkt somit

proportional zur Quadratwurzel der Zeit anstieg, belegt der lineare Zusammenhang zwischen der mittleren Abweichung zur Funktion der Zeit das zufällige Bewegungsmuster (WEI ET AL., 2003; BELTMAN ET AL., 2009). Der anfänglich typischerweise eher exponentielle Anstieg der mittleren Abweichung ist dabei durch die, innerhalb der ersten 1–3 min geradlinig vom initialen Startpunkt aus weg orientierte Migrationsausrichtung aller IEL zu erklären (BEAUCHEMIN ET AL., 2007; BELTMAN ET AL., 2009). Direkte, über längere Zeiträume gerichtete Bewegungen entlang eines chemotaktischen Gradienten würden sich dagegen in einer fortlaufend aufwärts gekrümmten Verlaufskurve und somit in einem deutlich höheren Anstieg der mittleren Abweichung äußern (SUMEN ET AL., 2004; BELTMAN ET AL., 2009; ZINSELMAYER ET AL., 2009).

Inwieweit die theoretischen Vorhersagen des Migrationsverhaltens der IEL unter Vernachlässigung ihrer absoluten Position im Epithel durch den Motilitätskoeffizienten  $M$  auf einzelne Zotten übertragbar sind, ist für Zeiträume von mehreren Stunden bis Tagen und einer mittleren Zottenoberfläche von  $0,156 \text{ mm}^2$  jedoch eher kritisch zu bewerten. Da sich mit der mittleren Abweichung folglich auch das überwachte Areal der IEL über die Zeit kontinuierlich erweitert, scheint ein stetig expandierendes Überwachungsgebiet trotz der Migration nach dem Zufallsprinzip dennoch ein entscheidender Faktor der epithelialen Überwachungsstrategie zu sein – und nicht auf einzelne Zotten begrenzt.

Auch in Lymphknoten wurde bereits ein zufälliges Bewegungsmuster mit vergleichbarem Geschwindigkeitsprofil vitaler T-Lymphozyten beschrieben (MILLER ET AL., 2002; MILLER ET AL., 2003). So wurden innerhalb des sekundär lymphatischen Gewebes, in Abwesenheit von Antigenen, ebenso durchschnittliche T-Zell-Geschwindigkeiten von  $10\text{--}11 \text{ }\mu\text{m}/\text{min}$ , Maximalgeschwindigkeiten über  $25 \text{ }\mu\text{m}/\text{min}$  sowie variierende momentane Geschwindigkeiten einzelner T-Zellen von einem Aufzeichnungszeitpunkt zum nächsten detektiert (MILLER ET AL., 2002; BOUSSO UND ROBEY, 2003; MILLER ET AL., 2003). Trotz des dicht gepackten Epithelzellverbands intestinaler Zotten unterscheidet sich die Dynamik der IEL somit nicht von der naiver T-Lymphozyten in Lymphknoten. Allerdings quantifizierten Klinger et al. Geschwindigkeiten von LPL im intestinalen Schleimhautbindegewebe von durchschnittlich  $11,8 \text{ }\mu\text{m}/\text{min}$  (KLINGER ET AL., 2012), was somit doch auf einen Einfluss verschiedener Kompartimente und/oder Phänotypen auf die Dynamik migrierender T-Zellen hindeutet.

Während das Migrationsverhalten der IEL im Zottenepithel für große Lymphozytenzahlen rein Autofluoreszenz-basiert analysiert werden konnte, ließen sich Interaktionen mit dem umliegenden Gewebe – Epithelzell-Membrankontakte sowie Fortsätze und Zelldurch-

tritte vom Epithel in die Lamina propria und umgekehrt – aufgrund der weitgehend fehlenden Autofluoreszenz der Lymphozyten jedoch erst durch die spezifische Markierung ihrer Zellmembran im Detail verfolgen und quantifizieren. Übereinstimmende morphologische Merkmale und der Vergleich verschiedener Bewegungsparameter zeigten, dass weder eine Subpopulation von Lymphozyten untersucht noch die Zelldynamik und Viabilität der IEL durch die Membranmarkierung beeinflusst wurde. Zwar wurden ebenso bereits CD103<sup>+</sup> DC im intestinalen Epithel identifiziert und beschrieben, allerdings beschränkt sich deren Anzahl unter physiologischen Bedingungen *in vivo* schätzungsweise lediglich auf 1–2 Zellen pro Zotte (FARACHE ET AL., 2013), sodass Verwechslungen mit positiv markierten IEL ausgeschlossen scheinen. Die, verglichen zu unmarkierten IEL, erhöhte mittlere momentane Geschwindigkeit und Einzelzell-Geschwindigkeit kann vielmehr durch eine deutlich präzisere räumlich-zeitliche Verfolgbarkeit markierter Lymphozyten sowie durch geringere Bestrahlungsintensitäten begründet werden (BELTMAN ET AL., 2009). So konnten zur Farbstoff-basierten Bildgebung neben niedrigeren Anregungsleistungen und höheren Scangeschwindigkeiten ebenso längere Wellenlängen genutzt werden.

Da der verwendete CD103<sup>+</sup>-FITC Antikörper, luminal appliziert, jedoch nicht frei in das intakte Zottenepithel diffundierte, geschweige denn über Endosomen und/oder lysosomale Granula der Enterozyten in den epithelialen Zellzwischenraum gelangte, bleibt über den Mechanismus der Markierung von IEL nur zu spekulieren. Unter physiologischen Bedingungen nicht membrangängig, könnte der Fluoreszenzmarker womöglich über eine stellenweise durchlässige Epithelbarriere des angrenzenden, methodisch bedingt möglicherweise nicht mehr ausreichend versorgten Schleimhautgewebes in den Interzellularraum gelangt sein. Ebenso könnten die beschriebenen Unterschiede der *tight junctions* zwischen intestinalen Zotten- und Kryptenepithelzellen (TRIER UND MADARA, 1981; NEUTRA, 1988) verschiedene Permeabilitäten des Epithels bedingen und möglichenfalls einen parazellulären Eintritt des Markers durch das intakte Epithel in der Nähe der Krypten implizieren (SHEN ET AL., 2011). Eine Aufnahme und Präsentation luminaler Farbstoffmoleküle über Becherzell-assoziierte Antigen-Passagen (MCDOLE ET AL., 2012; KNOOP ET AL., 2013) kann den Aufzeichnungen zufolge dagegen ausgeschlossen werden.

Übereinstimmend mit *ex vivo* Untersuchungen des FAE (REGOLI ET AL., 1994) konnten ferner weder ins Lumen ragende Fortsätze noch Zelldurchtritte intraepithelialer Lymphozyten beobachtet werden. So behielt der Zellverband während der Migration der IEL durch das Epithel apikal sein charakteristisches, pflastersteinartiges Mosaikmuster bei. Auch das, von mehreren Arbeitsgruppen außerhalb des lymphatischen Gewebes beschrie-

bene, parazelluläre Durchgreifen transepithelialer Dendriten einzelner, im Schleimhautbindegewebe lokalisierter DC ins Darmlumen (RESCIGNO ET AL., 2001; NIESS ET AL., 2005; CHIEPPA ET AL., 2006) konnte *in vivo* nicht bestätigt werden. Da diesen *ex situ* Ergebnissen allerdings eine Exposition der Schleimhaut mit Lipopolysacchariden bzw. verschiedenen Bakterien vorausging und somit, vermittelt über *toll-like*-Rezeptoren der Epithelzellen, eine Aktivierung des Darm-assoziierten Immunsystems zugrunde lag, scheint die Aufnahme luminaler Antigene durch DC auf einer Stimulation, Aktivierung oder Schädigung des Epithels zu beruhen (VALLON-EBERHARD ET AL., 2006; FARACHE ET AL., 2013; KNOOP ET AL., 2013). Im gesunden Dünndarm, in der Abwesenheit von *toll-like*-Rezeptoren oder anderen aktivierenden Signalen, bleibt die Integrität des epithelialen Zellverbands dagegen ohne ein Durchgreifen trans- sowie intraepithelialer Zellfortsätze ins Lumen erhalten.

Den Interaktionen zwischen IEL und den residenten Epithelzellen kommt allerdings sowohl bei der Sicherstellung der Barrierefunktion als auch der initialen Immunantwort auf invasive Pathogene eine entscheidende Bedeutung zu. So belegen vorhergehende Untersuchungen einen deutlichen Zusammenhang zwischen einer gestörten Migration  $\gamma\delta^+$  IEL und dem Eintritt luminaler Krankheitserreger ins intestinale Epithel (EDELBLUM ET AL., 2015). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten erstmals, dass die, unter physiologischen Bedingungen amöbenähnlich durch das Epithel patrouillierenden IEL pro Minute durchschnittlich 4,1 neue Epithelzellen kontaktieren und somit, bedingt durch ihr zufälliges Migrationsverhalten, eine kontinuierliche und flächendeckende Überwachung des gesamten Epithelzellverbands ermöglichen. Trotz ihrer relativ geringen Anzahl im Verhältnis zu intestinalen Epithelzellen wird eine individuelle Epithelzelle statistisch dabei etwa alle 73 sec von mindestens einem IEL kontaktiert, 99,9% aller Epithelzellen innerhalb von rund 12 min mindestens einmal durch einen IEL kontaktiert. Als eine der ersten Verteidigungslinien der mukosalen Immunabwehr sichert die Dynamik intraepithelialer Lymphozyten somit die Überprüfung jeder einzelnen Epithelzelle in äußerst kurzen Zeitabständen, dient der sofortigen Immunreaktion auf eine mögliche Invasion enterischer Pathogene, und stellt dadurch einen entscheidenden Mechanismus dar, epitheliale Verletzungen und Infektionen über die enorme Oberfläche der Dünndarmschleimhaut hinweg zu verhindern.

Über die transienten Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte hinaus wurden zudem erstmals Fortsätze und Zelldurchtritte markierter Lymphozyten durch die Poren der Basalmembran aufgezeichnet und damit direkte Interaktionen der IEL zwischen dem intraepithelialen Kompartiment und der Lamina propria der gesunden Dünndarmschleimhaut *in*

*vivo* quantifiziert. Wenngleich dabei, methodisch bedingt, keine Interaktionen mit anderen Immunzellen beobachtet werden konnten, so suggerieren die dynamischen Prozesse doch einen stetigen Informationsaustausch zwischen beiden angrenzenden Kompartimenten, wobei IEL nicht auf das Epithel begrenzt und auch LPL eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen der Resorptionsfläche und dem Körperinneren einzunehmen scheinen.

### 5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit gelang es, die Dynamik der intraepithelialen Lymphozyten als einen wesentlichen Bestandteil der epithelialen Schutzbarriere zu quantifizieren und die daraus resultierende, kontinuierliche Überwachung der epithelialen Integrität aufzuklären. Obwohl sich die Standardabweichung innerhalb der unimodal symmetrischen Häufigkeitsverteilung aller momentanen Geschwindigkeiten trotz individuell verschiedener Einzelzell-Geschwindigkeiten bereits auf jeden einzelnen IEL zurückführen lässt, ist der tatsächliche Beweis für ein Phänotyp-unabhängiges Migrationsverhalten der IEL nur unzureichend erbracht. So geben die Daten in erster Linie Hinweise auf ein womöglich oszillierendes Bewegungsmuster. Durch kombinierte Intravitalmarkierungen mithilfe spezifischer, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper könnten jedoch, wie bereits für B- und T-Zellen im Lymphknoten beschrieben (MILLER ET AL., 2002), gesicherte Aussagen zum Einfluss des Phänotyps auf die Geschwindigkeit und Verteilung der intraepithelialen Lymphozyten getroffen werden.

Durch die Verwendung von *knock-out*-Mäusen konnte die physiologische Bedeutung einzelner Transmembranproteine *in vivo* bereits intensiv untersucht und Occludin als essentieller Faktor der intraepithelialen Lymphozytenmigration und Epithelzell-Interaktion identifiziert werden (EDELBLUM ET AL., 2012). Der Beitrag epithelialer Interdigitationen sowie der Basalmembran zum Migrationsverhalten der IEL wurde bislang jedoch nicht erfasst. Mithilfe transgener Mäuse könnten die Zellmembran der Enterozyten sowie die Poren der Basallamina selektiv visualisiert und weitere Einblicke in die Dynamik der intravitalen Lymphozyten-Epithelzell-Membrankontakte sowie Interaktionen mit der angrenzenden Lamina propria gewonnen werden.

Neben der zellulären Kinetik der intraepithelialen Lymphozytenbewegung könnte ebenso die der subepithelialen Migration detektiert und, durch Visualisierung tieferer Gewebeschichten, zusätzlich Immunzellvorgänge im vitalen Schleimhautbindegewebe aufge-

zeichnet werden. Zwar limitiert eine ausreichend hohe räumliche und zeitliche Auflösung die Aufzeichnung größerer 3D-Bildstapel (BELTMAN ET AL., 2009), ein Kompromiss zwischen dem Gewebevolumen und der Dauer eines Aufzeichnungszeitpunktes zum nächsten könnte jedoch die Verfolgung markierter Lymphozyten aus dem Epithel in tiefere Gewebeschichten ermöglichen und Antigen-unspezifische Interaktionen mit anderen Immunzellen im intakten Schleimhautbindegewebe visualisieren. Die Kombination aus Zwei-Photonen-Absorption und dem *SHG*-Signal könnte dabei zusätzliche Informationen über die räumliche Kollokalisierung der Lymphozyten mit umliegenden Kollagenfasern der extrazellulären Matrix liefern.

Letztlich könnten durch die Verfolgung der Invasion pathogener Krankheitserreger, durch Generierung von Epithelläsionen sowie durch die Verwendung eines *in vivo* Mausmodells mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung intestinale Entzündungsprozesse in ihrer Dynamik erforscht, Änderungen der Bewegungsparameter intraepithelialer Lymphozyten im Rahmen einer Antigenerkennung analysiert und, ausgehend von den Beobachtungen im gesunden Gewebe, Interaktionen der IEL mit Epithelzellen und anderen Immunzellen unter pathologischen Bedingungen genauer charakterisiert werden. Das Verständnis der Rolle intraepithelialer Lymphozyten im Rahmen intravitaler Immunreaktionen kann zu einem gezielteren therapeutischen Ansatz bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen des Dünndarms beitragen. Die Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie wird hierbei ein maßgeblicher Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- ABBAS B., HAYES T.L., WILSON D.J., AND CARR K.E. 1989. Internal structure of the intestinal villus: Morphological and morphometric observations at different levels of the mouse villus. *Journal of Anatomy*, **162**:263–273
- ABE K., AND ITO T. 1977. A qualitative and quantitative morphological study of Peyer's patches of the mouse. *Arch Histol Japan*, **40**:407–420
- AGACE W.W. 2008. T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol*, **29**:514–522
- AKIBA Y., AND KAUNITZ J.D. 2011. Duodenal chemosensing and mucosal defences. *Digestion*, **83**:25–31
- AUMÜLLER G., AUST G., ENGELE J., KIRSCH J., MAIO G., MAYERHOFER A., MENSE S., REIBIG D., SALVETTER J., SCHMIDT W., SCHMITZ F., SCHULTE E., SPANEL-BOROWSKI K., WENNEMUTH G., WOLFF W., WURZINGER L.J., AND ZILCH H.G. 2014. *Duale Reihe Anatomie 3. Auflage*, Georg Thieme Verlag KG
- BANSIL R., STANLEY E., AND LAMONT J.T. 1995. Mucin biophysics. *Annu Rev Physiol*, **57**:635–57
- BARKER N. 2014. Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**:19–33
- BARRY R.E. JR. 1976. Mucosal surface area and villous morphology of the small intestine of small mammals: functional interpretations. *J Mammal*, **57**:273–290
- BAUMGART J., KUETEMEYER K., BINTIG W., NGEZAHAYO A., ERTMER W.A., LUBATSCHOWSKI H., AND HEISTERKAMP A. 2009. Repetition rate dependency of reactive oxygen species formation during femtosecond laser-based cell surgery. *Journal of Biomedical Optics*, **14**:054040
- BEAGLEY K.W., FUJIIHASHI K., LAGOO A.S., LAGOO-DEENADAYLAN S., BLACK C.A., MURRAY A.M., SHARMANOV A.T., YAMAMOTO M., MCGHEE J.R., AND ELSON C.O. 1995. Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine. *The Journal of Immunology*, **154**:5611–5619
- BEAUCHEMIN C., DIXIT N.M., AND PERELSON A.S. 2007. Characterizing T cell movement within lymph nodes in the absence of antigen. *The Journal of Immunology*, **178**:5505–5512
- BECK B. 1989. Gastric inhibitory polypeptide: A gut hormone with anabolic functions. *J Mol Endocrinol*, **2**:169–174

- BELTMAN J.B., MARÉE A.F.M., AND DE BOER R.J. 2009. Analysing immune cell migration. *Nature Reviews Immunology*, **9**:789–798
- BENNETT B.D., JETTON T.L., YING G., MAGNUSON M.A., AND PISTON D.W. 1996. Quantitative subcellular imaging of glucose metabolism within intact pancreatic islets. *The Journal of Biology Chemistry*, **271**:3647–3651
- BEVINS C.L. 2006. Paneth cell defensins: Key effector molecules of innate immunity. *Biochemical Society Transactions*, **34**:263–266
- BEVINS C.L., AND SALZMAN N.H. 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, **9**:356–68
- BEZENCON C., COUTRE J., AND DAMAK S. 2007. Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem Senses*, **32**:41–49
- BIENENSTOCK J., MCDERMOTT M., BEFUS D., AND O'NEILL M. 1978. A common mucosal immunological system involving the bronchus, breast and bowel. *Secretory Immunity and Infection*, pp.53–59
- BJARNASON I., MACPHERSON A., AND HOLLANDER D. 1995. Intestinal permeability: An overview. *Gastroenterology*, **108**:1566–1581
- BJERKNES M., AND CHENG H. 1999. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*, **116**:7–14
- BJERKNES M., KHANDANPOUR C., MÖRÖY T., FUJIYAMA T., HOSHINO M., KLISCH T.J., DING Q., GAN L., WANG J., AND MARTÍN M.G. 2012. Origin of the brush cell lineage in the mouse intestinal epithelium. *Developmental Biology*, **362**:194–218
- BLOOM W., AND FAWCETT D.W. 1975. A textbook of histology, 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. In: (ed. by) Weiss L.: Cell and tissue biology: A textbook of histology. 6<sup>th</sup> Edition, Chapter 21, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich, 1988 (p. 643–683)
- BÖLKE T., KRAPF L., ORZEKOWSKY-SCHROEDER R., VOSSMEYER T., DIMITRIJEVIC J., WELLER H., SCHÜTH A., KLINGER A., HÜTTMANN G., AND GEBERT A. 2014. Data-adaptive image-denoising for detecting and quantifying nanoparticle entry in mucosal tissues through intravital 2-photon microscopy. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **5**:2016–2025
- BOUSSO P., AND ROBEY E. 2003. Dynamics of CD8<sup>+</sup> T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol*, **4**:579–585
- BRANDTZAEG P., BAEKKEVOLD E.S., FARSTAD I.N., JAHNSEN F.L., JOHANSEN F.-E., NILSEN E.M., AND YAMANAKA T. 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: What happens in the microcompartments? *Immunology Today*, **20**:141–151



- BUCHAN A.M. 1999. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut III. Endocrine cell recognition of luminal nutrients. *American Journal of Physiology*, **277**:1103–1107
- BYE W.A., ALLAN C.H., AND TRIER J.S. 1984. Structure, organization and distribution of M cells in Peyer's patches. *Gastroenterology*, **86**:789–801
- CAHALAN M.D., PARKER I., WEI S.H., AND MILLER M.J. 2002. Two-photon tissue imaging: Seeing the immune system in a fresh light. *Nature Reviews Immunology*, **2**:872–880
- CALDWELL C.C., KOJIMA H., LUKASHEV D., ARMSTRONG J., FARBER M., APASOV S.G., AND SITKOVSKY M.V. 2001. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *The Journal of Immunology*, **167**:6140–6149
- CAMPAGNOLA P.J., CLARK H.A., MOHLER W.A., LEWIS A., AND LOEW L.M. 2001. Second-harmonic imaging microscopy of living cells. *J Biomed Opt*, **6**:277–286
- CAMPAGNOLA P.J., AND LOEW L.M. 2003. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotechnology*, **21**:1356–1360
- CARPENTER A.C., AND BOSSELUT R. 2010. Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunol*, **11**:666–673
- CASLEY-SMITH J.R., AND GANNON B.J. 1984. Intestinal microcirculation: Spatial organization and fine structure. In: (ed. by) Shepherd A.P. and Granger D.N.: *Physiology of the intestinal circulation*. Raven Press, New York (p. 9–31)
- CASTELEYN C., REKECKI A., VAN DER AA A., SIMOENS P., AND VAN DER BROECK W. 2010. Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. *Laboratory Animals*, **44**:176–183
- CEPEK K.L., SHAW S.K., PARKER C.M., RUSSEL G.J., MORROW J.S., RIMM D.L., AND BRENNER M.B. 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the  $\alpha_E\beta_7$  integrin. *Nature*, **372**:190–193
- CHEN Y., CHOU K., FUCHS E., HAVRAN W.L., AND BOISMENU R. 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**:14338–14343
- CHENG H., AND LEBLOND C.P. 1974a. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell. *American Journal of Anatomy*, **141**:461–480
- CHENG H., AND LEBLOND C.P. 1974b. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine II. Mucous cells. *American Journal of Anatomy*, **141**:481–502

- CHENG H., AND LEBLOND C.P. 1974c. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *American Journal of Anatomy*, **141**:537–562
- CHENNUPATI V., WORBS T., LIU X., MALINARICH F.H., SCHMITZ S., HAAS J.D., MALISSEN B., FÖRSTER R., AND PRINZ I. 2010. Intra- and intercompartmental movement of  $\gamma\delta$  T cells: Intestinal intraepithelial and peripheral  $\gamma\delta$  T cells represent exclusive non-overlapping populations with distinct migration characteristics. *The Journal of Immunology*, **185**:5160–5168
- CHEROUTRE H. 2004. Starting at the beginning: New perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol*, **22**:217–246
- CHEROUTRE H., LAMBOLEZ F., AND MUCIDA D. 2011. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, **11**:445–456
- CHEY W.Y., AND CHANG T. 2001. Neuronal hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion. *Pancreatology*, **1**:320–335
- CHIEPPA M., RESCIGNO M., HUANG A.Y.C., AND GERMAIN R.N. 2006. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *The Journal of Experimental Medicine*, **203**:2841–2852
- CHOE K., JANG J.Y., PARK I., KIM Y., AHN S., PARK D.-Y., HONG Y.-K., ALITALO K., KOH G.Y., AND KIM P. 2015. Intravital imaging of intestinal lacteals unveils lipid drainage through contractility. *The Journal of Clinical Investigation*, **125**:4042–4052
- CHU H., PAZGIER M., JUNG G., NUCCIO S.-P., CASTILLO P.A., DE JONG M.F., WINTER M.G., WINTER S.E., WEHKAMP J., SHEN B., SALZMAN N.H., UNDERWOOD M.A., TSOLIS R.M., YOUNG G.M., LU W., LEHRER R.I., BÄUMLER A.J., AND BEVINS C.L. 2012. Human  $\alpha$ -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science*, **337**:477–481
- CLARKE R.M. 1972. The effect of growth and of fasting on the number of villi and crypts in the small intestine of the albino rat. *Journal of Anatomy*, **112**:27–33
- CLEVERS H.C., AND BEVINS C.L. 2013. Paneth cells: Maestros of the small intestinal crypts. *Annu Rev Physiol*, **75**:289–311
- COHEN B.E. 2010. Beyond fluorescence. *Nature*, **467**:407–408
- COLLAN Y., AND KALIMA T.V. 1970. The lymphatic pump of the intestinal villus of the rat. *Scand J Gastroenterol*, **5**:187–196
- CORNES J.S. 1965. Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine. *Gut*, **6**:225–229
- CRAWLEY S.W., MOOSEKER M.S., AND TYSKA M.J. 2014. Shaping the intestinal brush border. *The Journal of Cell Biology*, **207**:441–451

- CROSNIER C., STAMATAKI D., AND LEWIS J. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: Stem cell, signals and combinatorial control. *Nature Review Genetics*, **7**:349–359
- CROWE P.T., AND MARSH M.N. 1994. Morphometric analysis of intestinal mucosa VI. Principles in enumerating intra-epithelial lymphocytes. *Virchows Archiv*, **424**:301–306
- CUMMINGS D.E., AND OVERDUIN J. 2007. Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of Clinical Investigation*, **117**:13–23
- DENK W., STRICKLER J.H., AND WEBB W.W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, **248**:73–76
- DENK W., AND SVOBODA K. 1997. Photon upmanship: Why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*, **18**:351–357
- DENNING T.L., GRANGER S.W., MUCIDA D., GRADDY R., LECLERCQ G., ZHANG W., HONEY K., RASMUSSEN J.P., CHEROUTRE H., RUDENSKY A.Y., AND KRONENBERG M. 2007. Mouse TCR $\alpha\beta^+$  CD8 $\alpha\alpha$  intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *The Journal of Immunology*, **178**:4230–4239
- DOCKRAY G.J. 2003. Luminal sensing in the gut: An overview. *J Physiol Pharmacol*, **54**:9–17
- EDELBLUM K.L., SHEN L., WEBER C.R., MARCHIANDO A.M. CLAY B.S. WANG Y., PRINZ I., MALISSEN B., SPERLING A.I., AND TURNER J.R. 2012. Dynamic migration of  $\gamma\delta$  intraepithelial lymphocytes requires occludin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**:7097–7102
- EDELBLUM K.L., SINGH G., ODENWALD M.A., LINGARAJU A., BISSATI K.E., MCLEOD R., SPERLING A.I., AND TURNER J.R. 2015.  $\gamma\delta$  intraepithelial lymphocyte migration limits transepithelial pathogen invasion and systemic disease in mice. *Gastroenterology*, **148**:1417–1426
- EREZ N., BERSHADSKY A., AND GEIGER B. 2005 Signaling from adherens-type junctions. *European Journal of Cell Biology*, **84**:235–244
- ERLANDSEN S.L., PARSONS J.A., AND TAYLOR T.D. 1974. Ultrastructural immunocytochemical localization of lysozyme in the Paneth cells of man. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **22**:401–413
- ERMUND A., SCHÜTTE A., JOHANSSON M.E.V., GUSTAFSSON J.K., AND HANSSON G.C. 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **305**:341–347

- FARACHE J., KOREN I., MILO I., GUREVICH I., KIM K.-W., ZIGMOND E., FURTADO G.C., LIRA S.A., AND SHAKHAR G. 2013. Luminal bacteria recruit CD103<sup>+</sup> dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity*, **38**:581–595
- FERGUSON A. 1977. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut*, **18**:921–937
- FISHER R.B., AND PARSONS D.S. 1950. The gradient of mucosal surface area in the small intestine of the rat. *Journal of Anatomy*, **84**:272–282
- FORRESTER J.M. 1972. The number of villi in rat's jejunum and ileum: effect of normal growth, partial enterectomy, and tube feeding. *Journal of Anatomy*, **111**:283–291
- FORSTNER J.F., OLIVER M.G., AND SYLVESTER F.A. 1995. Production, structure, and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: Blaser M.J., Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B., Guerrant R.L. (ed. by) *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press (p. 71–88)
- FREY A., GIANNASCA K.T., WELTZIN R., GIANNASCA P.J., REGGIO H., LENCER W.I., AND NEUTRA M.R. 1996. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: Implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *The Journal of Experimental Medicine*, **184**:1045–1059
- FUJIIHASHI K., DOHI T., KWEON M.N., MCGHEE J.R., KOGA T., COOPER M.D., TONEGAWA S., AND KIYONO H. 1999.  $\gamma\delta$  T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int Immunol*, **11**:1907–1916
- GABELLA G. 1987. The cross-ply arrangement of collagen fibres in the submucosa of the mammalian small intestine. *Cell and Tissue Research*, **248**:491–497
- GANGADHARAN D., LAMBOLEZ F., ATTINGER A., WANG-ZHU Y., SULLIVAN B.A., AND CHEROUTRE H. 2006. Identification of pre- and postselection TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> intraepithelial lymphocyte precursors in the thymus. *Immunity*, **25**:631–641
- GAUDERON R., LUKINS P.B., AND SHEPPARD C.J. 2001. Simultaneous multichannel nonlinear imaging: Combined two-photon excited fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Micron*, **32**:685–689
- GEBERT A. 1997. The role of M cells in the protection of mucosal membranes. *Histochem Cell Biol*, **108**:455–470
- GEBERT A., ROTHKÖTTER H.J., AND PABST R. 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *International Review of Cytology*, **167**:91–159
- GEBERT A., STEINMETZ I., FASSBENDER S., AND WENDLANDT K.-H. 2004. Antigen transport into Peyer's patches. Increased uptake by constant numbers of M cells. *American Journal of Pathology*, **164**:65–72

- GEBHARD A., AND GEBERT A. 1999. Brush cells of the mouse intestine possess a specialized glycocalyx as revealed by quantitative lectin histochemistry: Further evidence for a sensory function. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **47**:799–808
- GERBE F., ES J., MAKRINI L., BRULIN B., MELLITZER G., ROBINE S., ROMAGNOLO B., SHROYER N.F., BOURGAUX J.F., PIGNODEL C., CLEVERS H., AND JAY P. 2011. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*, **192**:767–780
- GERBE F., LEGRAVEREND C., AND JAY P. 2012. The intestinal epithelium tuft cells: Specification and function. *Cellular And Molecular Life Sciences*, **69**:2907–2917
- GÖPPERT-MAYER M. 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, **401**:273–294
- GOODMAN T., AND LEFRANCOIS L. 1989. Intraepithelial lymphocytes. Anatomical site, not T cell receptor form, dictates phenotype and function. *The Journal of Experimental Medicine*, **170**:1569
- GRASBECK R., KOVVONEN I., LUNDBERG M., AND TENHUNEN R. 1979. An intestinal receptor for heme. *Scand J Haematol*, **23**:5–9
- GROSSMANN J., MOHR S., LAPETINA E.G., FIOCCHI C., AND LEVINE A.D. 1998. Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology*, **274**:G1117–G1124
- GÜNTHER C., NEUMANN H., NEURATH M.F., AND BECKER C. 2013. Apoptosis, necrosis and necroptosis: Cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut*, **62**:1062–1071
- GUY-GRAND D., AND VASSALLI P. 1993. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, **5**:247–252
- GUY-GRAND D., CERF-BENSUSSAN N., MALISSEN B., MALASSIS-SÉRIS M., BRIOTTET C., AND VASSALLI P. 1991. Two gut intraepithelial CD8<sup>+</sup> lymphocyte populations with different T cell receptors: A role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med*, **173**:471–481
- GUY-GRAND D., CUÉNOD-JABRI B., MALASSIS-SÉRIS M., SELZ F., AND VASSALLI P. 1996. Complexity of the mouse gut T cell immune system: Identification of two distinct natural killer T cell intraepithelial lineages. *Eur J Immunol*, **26**:2248–2256
- GUY-GRAND D., DISANTO J.P., HENCHOZ P., MALASSIS-SÉRIS M., AND VASSALLI P. 1998. Small bowel enteropathy: Role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, INF- $\gamma$ , TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur J Immunol*, **28**:730–744

- HAGEMANN R.F., SIGDESTAD C.P., AND LESHER S. 1970. A quantitative description of the intestinal epithelium of the mouse. *American Journal of Anatomy*, **129**:41–52
- HALL P.A., COATES P.J., ANSARI B., AND HOPWOOD D. 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: The importance of apoptosis. *Journal of Cell Science*, **107**:3569–3577
- HELANDER H.F., AND FÄNDRIKS L. 2014. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **49**:681–689
- HELENIUS A., MARSH M., AND WHITE J. 1980. The entry of viruses into animal cells. *TIBS*, **104**:104–106
- HELMCHEN F., AND DENK W. 2002. New developments in multiphoton microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*, **12**:593–601
- HELMCHEN F., AND DENK W. 2005. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth Vol.2*, **12**:932–940
- HÖFER D., PÜSCHEL B., AND DRENCKHAHN D. 1996. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of  $\alpha$ -gustducin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**:6631–6634
- HÖFER D., AND DRENCKHAHN D. 1998. Identification of the taste cell G-protein,  $\alpha$ -gustducin, in brush cells of the rat pancreatic duct system. *Histochem Cell Biol*, **110**:303–309
- HÖFER D., ASAN E., AND DRENCKHAHN D. 1999. Chemosensory perception in the gut. *American Physiological Society*, **14**:18–23
- HOFMANN C., OBERMEIER F., ARTINGER M., HAUSMANN M., FALK W., SCHOELMERICH J., ROGLER G., AND GROSSMANN J. 2007. Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, **132**:587–600
- HORIUCHI K., NAITO I., NAKANO K., NAKATANI S., NISHIDA K., TAGUCHI T., AND OHTSUKA A. 2005. Three-dimensional ultrastructure of the brush border glycocalyx in the mouse small intestine: A high resolution scanning electron microscopy study. *Arch Histol Cytol*, **68**:51–56
- HUANG S., HEIKAL A.A., AND WEBB W.W. 2002. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophysical Journal*, **82**:2811–2825
- INAGAKI-OHARA K., CHINEN T., MATSUZAKI G., SASAKI A., SAKAMOTO Y., HIROMATSU K., NAKAMURA-UCHIYAMA F., NAWA Y., AND YOSHIMURA A. 2004. Mucosal T cells bearing TCR $\gamma\delta$  play a protective role in intestinal inflammation. *The Journal of Immunology*, **173**:1390–1398

- INAGAKI-OHARA K., DEWI F.N., HISAEDA H., SMITH A.L., JIMI F., MIYAHIRA M., ABDEL-ALEEM A.S.F., HORII Y., AND NAWA Y. 2006. Intestinal intraepithelial lymphocytes sustain the epithelial barrier function against *Eimeria vermiciformis* infection. *Infection and Immunity*, **74**:5292–5301
- INAGAKI-OHARA K., SAWAGUCHI A., SUGANUMA T., MATSUZAKI G., AND NAWA Y. 2005. Intraepithelial lymphocytes express junctional molecules in murine small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **331**:997–983
- ISHIKAWA H., NAITO T., IWANAGA T., TAKAHASHI-IWANAGA H., SUEMATSU M., HIBI T., NANNO M. 2007. *Curriculum vitae* of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunological Reviews*, **215**:154–165
- ISMAIL A.S., BEHRENDT C.L., AND HOOPER L.V. 2009. Reciprocal interactions between commensal bacteria and  $\gamma\delta$  intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *The Journal of Immunology*, **182**:3047–3054
- ITO S. 1965. The enteric surface coat on cat intestinal microvilli. *J Cell Biol*, **27**:475–491
- ITO S. 1969. Structure and function of the glycocalyx. *Fed Proc*, **28**:12–25
- JENSEN K.D., SU X., SHIN S., LI L., YOUSSEF S., YAMASAKI S., STEINMAN L., SAITO T., LOCKSLEY R.M., DAVIS M.M., BAUMGARTH N., AND CHIEN Y.H. 2008. Thymic selection determines  $\gamma\delta$  T cell effector fate: Antigen-naïve cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon  $\gamma$ . *Immunity*, **29**:90–100
- JOHANSSON M.E.V., AND HANSSON G.C. 2011. Keeping bacteria at a distance. *Science*, **334**:182–183
- JUNQUIERA L.C., CARNEIRO J., AND CONTOPOULOS A. 1971. Basic histology, 2<sup>nd</sup> ed. Los Altos, CA: Lange Medical Publications. In: (ed. by) Weiss L.: Cell and tissue biology: A textbook of histology. 6<sup>th</sup> Edition, Chapter 21, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich, 1988 (p. 643–683)
- KARARLI T.T. 1995 Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos*, **16**:351–380
- KENDALL C.W., RAO A.V., JANEZIC S.A., TEMKIN R.J., HOLLENBERG M.J., AND LEA P.J. 1991. Tridimensional ultrastructure of perfusion fixed gastrointestinal epithelial cells by high resolution scanning electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy Technique*, **18**:223–230
- KILSHAW P.J., AND MURANT S.J. 1990. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur J Immunol*, **20**:2201–2207
- KIM Y.S., AND HO S.B. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, **12**:319–330

- KLINGER A., ORZEKOWSKY-SCHROEDER R., VON SMOLINSKI D., BLESSENOHL M., SCHUETH A., KOOP N., HÜTTMANN G., AND GEBERT A. 2012. Complex morphology and functional dynamics of vital murine intestinal mucosa revealed by autofluorescence 2-photon microscopy. *Histochem Cell Biol*, **137**:269–278
- KLINGER A., KRAPF L., ORZEKOWSKY-SCHROEDER R., KOOP N., VOGEL A., AND HÜTTMANN G. 2015. Intravital autofluorescence 2-photon microscopy of murine intestinal mucosa with ultra-broadband femtosecond laser pulse excitation: image quality, photodamage, and inflammation. *Journal of Biomedical Optics*, **20**:116001(1–13)
- KNOOP K.A., MILLER M.J., AND NEWBERRY R.D. 2013. Trans-epithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes. *Curr Opin Gastroenterol*, **29**:112–118
- KÖNIG K. 2000. Multiphoton microscopy in life sciences. *Journal of Microscopy*, **200**:83–104
- KOMANO H., FUJIURA Y., KAWAGUCHI M., MATSUMOTO S., HASHIMOTO Y., OBANA S., MOMBAERTS P., TONEGAWA S., YAMAMOTO H., ITOHARA S., NANNO M., AND ISHIKAWA H. 1995. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**:6147–6151
- KOMURO T., AND HASHIMOTO Y. 1990. Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa). *Arch Histol Cytol*, **53**:1–21
- KOMURO T., SHIMIZU D., HASHIMOTO Y., TAKEUCHI K., AND NANGO N. 1994. Application of a new morphometry system based on SEM stereo-pairs to the study of intestinal mucosa of rodents. *Journal of Electron Microscopy*, **43**:72–76
- KONJAR Š., FERREIRA C., BLANKENHAUS B., AND VELDHOEN M. 2017. Intestinal barrier interactions with specialized CD8 T cells. *Front Immunol*, **8**:1281
- KULENKAMPPF H. 1975. The structural basis of intestinal absorption. In: (ed. by) Forth, W. and Rummel, W.: *International encyclopedia of pharmacology and therapeutics*. Section 39B, Vol.1, Chapter 1. Pergamon Press, Oxford, 1975 (p. 1–69)
- LANGENBECK A. 1996. Fassungsvermögen und innere Oberfläche des Darms von Weißzahnschnecken (Mammalia: Crocidurinae) unterschiedlicher Körpergröße. *Bonn. zool. Beitr.*, Bd. 46, H. 1–4, 287–305
- LE BLEU V.S., MACDONALD B., AND KALLURI R. 2007. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med*, **232**:1121–1129
- LEFRANCOIS L. 1991. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *The Journal of Immunology*, **147**:1746–1751



- LEFRANCOIS L. 1994. Basic aspects of intraepithelial lymphocyte immunobiology. In: Orga P.L., Mestecky J., Lamm M.E., Strober W., McGhee J.R., Bienenstock J., eds. Handbook of mucosal immunology. San Diego: Academic Press Inc, pp. 287–298
- LEFRANCOIS L., AND MASOPUST D. 2002. T cell immunity in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Curr Opin Immunol*, **14**:503–508
- LEISHMAN A.J., GAPIN L., CAPONE M., PALMER E., MACDONALD H.R., KRONENBERG M., AND CHEROUTRE H. 2002. Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted CD8 $\alpha\alpha^+$  T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides. *Immunity*, **16**:355–364
- LELOUARD H., FALLET M., DE BOVIS B., MÉRESSE S., AND GORVEL J.P. 2012. Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology*, **142**:592–601
- LEWIS L.D., AND FORDTRAN J.S. 1975. Effect of perfusion rate on absorption, surface area, unstirred water layer thickness, permeability, and intraluminal pressure in the rat ileum *in vivo*. *Gastroenterology*, **68**:1509–1516
- LIDDLE R.A., GOLDFINE I.D., ROSEN M.S., TAPLITZ R.A., AND WILLIAMS J.A. 1985. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *Journal of Clinical Investigations*, **75**:1144–1152
- LINDQUIST R.L., SHAKHAR G., DUDZIAK D., WARDEMANN H., EISENREICH T., DUSTIN M.L., AND NUSSENZWEIG M.C. 2004. Visualizing dendritic cell networks *in vivo*. *Nature Immunology*, **5**:1243–1250
- LORENZ-MEYER H., KÖHN R., UND RIECKEN E.O. 1976. Vergleich verschiedener morphometrischer Methoden zur Erfassung der Schleimhautoberfläche des Rattendünndarms und deren Beziehung zur Funktion. *Histochemistry*, **49**:123–129
- LÜLLMANN-RAUCH R. 2012. Taschenlehrbuch Histologie 4. Auflage, Georg Thieme Verlag KG
- MASTERS B.R., AND SO P.T.C. 2008. Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy. Oxford: Oxford University Press
- MACDONALD T.T., AND MONTELEONE G. 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, **307**:1920–1925
- MACDONALD T.T., AND PENDER S.L.F. 1998. Lamina propria T cells. MacDonald T.T. (ed): Mucosal T cells. Chem Immunol. Basel, Karger, **71**:103–117
- MACKENZIE I.L., AND DONALDSON R.M. 1969. Vitamine B-12 absorption and the intestinal cell surface. *Fed Proc*, **28**:41–45

- MADARA J.L. 1989. Loosing tight junctions. Lessons from the intestine. *Journal of Clinical Investigations*, **83**:1089–1094
- MALOY K.J., MOWAT A.M., ZAMOYSKA R., AND CRISPE I.N. 1991. Phenotypic heterogeneity of intraepithelial T lymphocytes from mouse small intestine. *Immunology*, **72**:555–562
- MARSH M.N., AND TRIER J.S. 1974. Morphology and cell proliferation of subepithelial fibroblasts in adult mouse jejunum. I. Structural features. *Gastroenterology*, **67**:622
- MAURY J., NICOLETTI C., GUZZO-CHAMBRAUD F., AND MAROUX S. 1995. The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization. *Eur J Biochem*, **228**:323–331
- MAWE G.M. 1991. The role of cholecystokinin in ganglionic transmission in the guinea-pig gall-bladder. *Journal of Physiology*, **439**:89–102
- MAYHEW T.M. 1984. Geometric model of the rat intestinal mucosa for stereological evaluation of villus amplification factors. *Journal of Microscopy*, **135**:337–346
- MAYHEW T.M., AND MIDDLETON C. 1985. Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat. A stereological study of their variability within and between animals. *Journal of Anatomy*, **141**:1–17
- MCDOLE J.R., WHEELER L.W., McDONALD K.G., WANG B., KONJUFCA V., KNOOP K.A., NEWBERRY R.D., AND MILLER M.J. 2012. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103<sup>+</sup> DCs in the small intestine. *Nature*, **483**:345–349
- MEMPEL T.R., HENRICKSON S.E., AND VON ANDRIAN U.H. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, **427**:154–159
- MENGEL J., CARDILLO F., AROEIRA L.S., WILLIAMS O., RUSSO M., AND VAZ N.M. 1995. Anti- $\gamma\delta$  T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunol Lett*, **48**:97–102
- MILLER M.J., WEI S.H., PARKER I., AND CAHALAN M.D. 2002. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science*, **296**:1869–1873
- MILLER M.J., WEI S.H., CAHALAN M.D., AND PARKER I. 2003. Autonomous T cell trafficking examined *in vivo* with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**:2604–2609
- MILLER M.J., SAFRINA O., PARKER I., AND CAHALAN M.D. 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4<sup>+</sup> T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of Experimental Medicine*, **200**:847–856
- MOE H. 1955. On goblet cells, especially of the intestine of some mammalian species. *Intern Rev Cytol*, **4**:299–334

- MOHLER W., MILLARD A.C., AND CAMPAGNOLA P.J. 2003. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods*, **29**:97–109
- MOORE R., CARLSON S., AND MADARA J.L. 1989. Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **257**:274–283
- MOOSEKER M.S., AND TILNEY L.G. 1975. Organization of an actin filament-membrane complex. *The Journal of Cell Biology*, **67**:725–743
- MORAN G.W., LESLIE F.C., LEVISON S.E., AND MCCLAUGHLIN J.T. 2008. Enteroendocrine cells: Neglected players in gastrointestinal disorders? *Therap Adv Gastroenterol*, **1**:51–60
- MOSLEY R.L., STYRE D., AND KLEIN J.R. 1990. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Int Immunol*, **2**:361–365
- MOWAT A.M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, **3**:331–341
- MOWAT A.M. AND AGACE W.W. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, **14**:667–685
- MOWAT A.M., AND VINEY J.L. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunological Reviews*, **156**:145–166
- MÜLLER S., BÜHLER-JUNGO M., AND MUELLER C. 2000. Intestinal intraepithelial lymphocytes exert potent protective cytotoxic activity during an acute virus infection. *The Journal of Immunology*, **164**:1986–1994
- MUNAKATA H., AND YOSIZAWA Z. 1980. Isolation and characterization of sulphated glycoproteins from the brush border fraction and the soluble fraction of rabbit small intestine. *J Biochem*, **87**:1559–1565
- NABEYAMA A., AND LEBLOND C.P. 1974. Caveolated cells characterized by deep surface invaginations and abundant filaments in mouse gastrointestinal epithelia. *American Journal of Anatomy*, **140**:147–166
- NEUTRA M.R. 1988. The gastrointestinal tract. In: (ed. by) Weiss L.: *Cell and tissue biology: A textbook of histology*. 6<sup>th</sup> Edition, Chapter 21, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich, 1988 (p. 643–683)
- NEUTRA M.R., FREY A., AND KRAEHENBUHL J.P. 1996a. Epithelial M cells: Gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, **86**:345–348
- NEUTRA M.R., MANTIS N.J., AND KRAEHENBUHL J.-P. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature Immunology*, **2**:1004–1009

- NEUTRA M.R., PRINGAULT E., AND KRAEHENBUHL J.P. 1996b. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* **14**:275–300
- NIESS J.H., AND REINECKER H.C. 2006. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cellular Microbiology*, **8**:558–564
- NIESS J.H., BRAND S., GU X., LANDSMAN L., JUNG S., MCCORMICK B.A., VYAS J.M., BOES M., PLOEGH H.L., FOX J.G., LITTMAN D.R., AND REINECKER H.C. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, **307**:254–258
- NUSRAT A., TURNER J.R., AND MADARA J.L. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: Nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **279**:G851–857
- OGATA M., OTA Y., MATSUTANI T., NANNO M., SUZUKI R., AND ITOH T. 2013. Granzyme B-dependent and perforin-independent DNA fragmentation in intestinal epithelial cells induced by anti-CD3 mAb-activated intraepithelial lymphocytes. *Cell Tissue Res*, **352**:287–300
- OGIOLDA L., WANKE R., ROTTMANN O., HERMANN S. W., AND WOLF E. 1998. Intestinal dimensions of mice divergently selected for body weight. *The Anatomical Record*, **250**:292–299
- OHEIM M., BEAUREPAIRE E., CHAIGNEAU E., MERTZ J., AND CHARPAK S. 2001. Two-photon microscopy in brain tissue: Parameters influencing the imaging depth. *Journal of Neuroscience Methods*, **111**:29–37
- OHEIM M., MICHAEL D.J., GEISBAUER M., MADSEN D., AND CHOW R.H. 2006. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**:788–808
- ORBERG J., BAER E., AND HILTNER A. 1983. Organization of collagen fibers in the intestine. *Connective Tissue Research*, **11**:285–297
- ORZEKOWSKY-SCHROEDER R., KLINGER A., MARTENSEN B., BLESSENHOHL M., GEBERT A., VOGEL A., AND HÜTTMANN G. 2011. *In vivo* spectral imaging of different cell types in the small intestine by two-photon excited autofluorescence. *Journal of Biomedical Optics*, **16**:116025(1–13)
- ORZEKOWSKY-SCHROEDER R., KLINGER A., FREIDANK S., LINZ N., ECKERT S., HÜTTMANN G., GEBERT A., AND VOGEL A. 2014. Probing the immune and healing response of murine intestinal mucosa by time-lapse 2-photon microscopy of laser-induced lesions with real-time dosimetry. *Biomedical Optics Express*, **5**:3521–3540

- OUELLETTE A.J. 2010. Paneth cells and innate mucosal immunity. *Curr Opin Gastroenterol*, **26**:547–553
- OWEN R.L. 1999. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches – a personal and historical perspective. *Seminars in Immunology*, **11**:157–163
- OWEN R.L., AND JONES A.L. 1974. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*, **66**:189–203
- PALERO J.A., BADER A.N., DE BRUIJN H.S., VAN DER PLOEG VAN DER HEUVEL A., STERENBORG H.J.C.M., AND GERRITSEN H.C. 2011. *In vivo* monitoring of protein-bound and free NADH during ischemia by nonlinear spectral imaging microscopy. *Biomed Opt Express*, **2**:1030–1039
- PANTAZIS P., MALONEY J., WU D., AND FRASER S.E. 2010. Second harmonic generating (*SHG*) nanoprobes for *in vivo* imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**:14535–14540
- PATTERSON G.H., KNOBEL S.M., ARKHAMMER P., THASTRUP O., AND PISTON D.W. 2000. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet  $\beta$  cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**:5203–5207
- PELASEYED T., BERGSTRÖM J.H., GUSTAFSSON J.K., ERMUND A., BIRCHENOUGH G.M.H., SCHÜTT A., VAN DER POST S., SVENSSON F., RODRÍGUEZ-PIÑEIRO A.M., NYSTRÖM E.E.L., WISING C., JOHANSSON M.E.V., AND HANSSON G.C. 2014. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev*, **260**:8–20
- PISTON D.W., AND KNOBEL S.M. 1999. Quantitative imaging of metabolism by two-photon excitation microscopy. *Methods Enzymol*, **307**:351–368
- POTTEN, C.S., AND LOEFFLER, M. 1990. Stem cells: Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties lessons for and from the crypt. *Development*, **110**:1001–1020
- POTTEN, C.S., BOOTH C., AND PRITCHARD D.M. 1997. The intestinal epithelial stem cell: The mucosal governor. *International Journal of Experimental Pathology*, **78**:219–243
- POTTER S.M. 1996. Vital imaging: Two photons are better than one. *Current Biology*, **6**:1595–1598
- POUSSIER P., NING T., BANERJEE D., AND JULIUS M. 2002. A unique subset of self-specific intraintestinal T cells maintains gut integrity. *J Exp Med*, **195**:1491–1497
- RAMBOURG A., AND LEBLOND C.P. 1967. Electron microscope observations on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *J Cell Biol*, **32**:27–53

- REGOLI M., BORGHESI C., BERTELLI E., AND NICOLETTI C. 1994. A morphological study of the lymphocyte traffic in Peyer's patches after an *in vivo* antigenic stimulation. The Anatomical Record, **239**:47–54
- REGOLI M., BERTELLI E., BORGHESI C., AND NICOLETTI C. 1995. Three-dimensional (3D-) reconstruction of M cells in rabbit Peyer's patches: Definition of the intraepithelial compartment of the follicle-associated epithelium. The Anatomical Record, **243**:19–26
- RESCIGNO M., URBANO M., VALZASINA B., FRANCOLINI M., ROTTA G., BONASIO R., GRANUCCI F., KRAEHENBUHL J.P., AND RICCIARDI-CASTAGNOLI P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol, **2**:361–367
- RESÉNDIZ-ALBOR A.A., ESQUIVEL R., LÓPEZ-REVILLA R., VERDÍN L., AND MORENO-FIERROS L. 2005. Striking phenotypic and functional differences in lamina propria lymphocytes from the large and small intestine of mice. Life Sciences, **76**:2783–2803
- RICHARDS-KORTUM R., AND SEVICK-MURACA E. 1996. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. Annu Rev Phys Chem, **47**:555–606
- ROSS G.A., AND MAYHEW T.M. 1985. Effects of fasting on mucosal dimensions in the duodenum, jejunum and ileum of the rat. Journal of Anatomy, **142**:191–200
- ROSS M.H., KAYE G.I., AND PAWLINA W. 2003. Histology A text and atlas with cell and molecular biology 4. Auflage, Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins
- SETTY S., WU S.J., BOGARD A., CHEJFEC G., CARROLL R., BENEDETTI E., JOHN E., AND SETTY A. 2011. Application of the paraboloidal model to assess mucosal changes following segmental intestinal transplantation in children. Transplantation Proceedings, **43**:1823–1830
- SHEN L., WEBER C.R., RALEIGH D.R., YU D., AND TURNER J.R. 2011. Tight junction pore and leak pathways: A dynamic duo. Annu Rev Physiol, **73**:283–309
- SHIN H.J. AND MEGO J.L. 1988. A rat liver lysosomal membrane flavin-adenine dinucleotide phosphohydrolase: Purification and characterization. Archives of Biochemistry and Biophysics, **267**:95–103
- SHIRES J., THEODORIDIS E., AND HAYDAY A.C. 2001. Biological insights into  $\gamma\delta^+$  and  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). Immunity, **15**:419–434
- SINGER A., ADORO S., AND PARK J.-H. 2008. Lineage fate and intense debate: Myths, models and mechanisms of CD4/CD8 lineage choice. Nature Reviews Immunology, **8**:788–801

- SMITH M.W., PATERSON J.Y.F., AND PEACOCK M.A. 1984. A comprehensive description of brush border membrane development applying to enterocytes taken from a wide variety of mammalian species. *Comp Biochem Physiol*, **77**:655–662
- STATON T.L., HABTEZION A., WINSLOW M.M., SATO T., LOVE P.E., AND BUTCHER E.C. 2006. CD8<sup>+</sup> recent thymic emigrants home to and efficiently repopulate the small intestine epithelium. *Nature Immunology*, **7**:482–488
- STERNINI C., ANSELM L., AND ROZENGURT E. 2008. Enteroendocrine cells: A site of taste in gastrointestinal chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, **15**:73–78
- STEVEN P., RUPP J., HÜTTMANN G., KOOP N., LENSING C., LAQUA H., AND GEBERT A. 2008. Experimental induction and three-dimensional two-photon imaging of conjunctiva-associated lymphoid tissue. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **49**:1512–1517
- STEVEN P., AND GEBERT A. 2008. Conjunctiva-associated lymphoid tissue – current knowledge, animal models and experimental prospects. *Ophthalmic Research*, **42**:2–8
- STOLL S., DELON J., BROTZ T.M., AND GERMAIN R.N. 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science*, **296**:1873–1876
- STRATER J., KORETZ K., GÜNTHER A.R., AND MÖLLER P. 1995. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut*, **37**:819–823
- STRUPLER M., PENA A.-M., HERNEST M., THARAUX P.-L., MARTIN J.-L., BEAUREPAIRE E., AND SCHANNE-KLEIN M.-C. 2007. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Optics Express*, **15**:4054–4065
- SUMEN C., MEMPEL T.R., MAZO I.B., AND VON ANDRIAN U.H. 2004. Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity*, **21**:315–329
- THÉVENAZ P., RUTTIMANN U.E., AND UNSER M. 1998. A pyramid approach to sub-pixel registration based on intensity. *IEEE Transactions on Image Processing*. vol. 7, no. 1, pp. 27–41
- TIRLAPUR U.K., KÖNIG K., PEUCKERT C., KRIEG R., AND HALBHUBER K.-J. 2001. Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death. *Experimental Cell Research*, **263**:88–97
- TREUTING P.M., DINTZIS S.M., AND MONTINE K.S. 2017. Comparative anatomy and histology: A mouse, rat, and human atlas. 2<sup>th</sup> Edition, Chapter 11, Academic Press

- TRIER J.S., ALLAN C.H., MARCIAL M.A., AND MADARA J.L. 1987. Structural features of the apical and tubulovesicular membranes of rodent small intestinal tuft cells. *Anat Rec*, **219**:69–77
- TRIER J.S., AND MADARA J.L. 1981. Physiology of the Gastrointestinal Tract Chapter 35 Functional morphology of the mucosa of the small intestine. Leonard R. Johnson, Raven Press, New York, 925–961
- VAISHNAVA S., BEHRENDT C.L., ISMAIL A.S., ECKMANN L., AND HOOPER L.V. 2008. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**:20858–20863
- VAISHNAVA S., YAMAMOTO M., SEVERSON K.M., RUHN K.A., YU X., KOREN O., LEY R., WAKELAND E.K., AND HOOPER L.V. 2011. The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*, **334**:255–258
- VALLON-EBERHARD A., LANDSMAN L., YOGEV N., VERRIER B., AND JUNG S. 2006. Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *The Journal of Immunology*, **176**:2465–2469
- VAN KRUININGEN H.J., WEST A.B., FRED A.B.J., AND HOLMES K.A. 2002. Distribution of Peyer's patches in the distal ileum. *Inflammatory Bowel Diseases*, **8**:180–185
- VON ANDRIAN U.H. 2002. T cell activation in six dimensions. *Science*, **296**:1815–1817
- WATSON A.J.M., AND PRITCHARD D.M. 2000. Lessons from genetically engineered animal models VII. apoptosis in intestinal epithelium: Lessons from transgenic and knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **278**:G1–G5
- WEI S.H., PARKER I., MILLER M.J., AND CAHALAN M.D. 2003. A stochastic view of lymphocyte motility and trafficking within the lymph node. *Immunological Reviews*, **195**:136–159
- WELSCH U., KUMMER W., UND DELLER T. 2012. *Lehrbuch Histologie 4. Auflage*, Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag
- WOLCZUK K., WILCZYŃSKA B., JAROSZEWSKA M., AND KOBAK J. 2011. Morphometric characteristics of the small and large intestines of *Mus musculus* during postnatal development. *Folia Morphol*, **70**:252–259
- WOLF J.L., AND BYE W.A. 1984. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu Rev Med*, **35**:95–112
- WRIGHT N.A., AND ALISON M. 1984. *The biology of epithelial cell populations*. Clarendon Oxford Press.
- XU D., CUI J., BANSAL R., HAO X., LIU J., AND PETERSON B.S. 2009. The ellipsoidal area ratio (EAR): An alternative anisotropy index for diffusion tensor imaging. *Magn Reson Imaging*, **27**:311–323



- YUAN J., AND KROEMER G. 2010. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & Development*, **24**:2592–2602
- ZEITZ M., SCHIEFERDECKER H.L., ULLRICH R., JAHN H.-U., JAMES S.P., AND RIECKEN E.-O. 1991. Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunol Res*, **10**:199–206
- ZHANG Q.Q., PISTON D.W., AND GOODMAN R.H. 2002. Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science*, **295**:1895–1897
- ZINSELMAYER B.H., DEMPSTER J., GURNEY A.M., WOKOSIN D.L., MILLER M., HO H., MILLINGTON O.R., SMITH K.M., RUSH C.M., PARKER I., CAHALAN M., BREWER J.M., AND GARSIDE P. 2005. *In situ* characterization of CD4<sup>+</sup> T cell behavior in mucosal and systemic lymphoid tissues during the induction of oral priming and tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, **201**:1815–1823
- ZINSELMAYER B.H., DEMPSTER J., WOKOSIN D.L., CANNON J.J., PLESS R., PARKER I., AND MILLER M. 2009. Chapter 16. Two-photon microscopy and multidimensional analysis of cell dynamics. *Methods in Enzymology*, **461**:349–378
- ZIPFEL W.R., WILLIAMS R.M., CHRISTIE R., NIKITIN A.Y., HYMAN B.T., AND WEBB W.W. 2003a. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**:7075–7080
- ZIPFEL W.R., WILLIAMS R.M., AND WEBB W.W. 2003b. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, **21**:1369–1377
- ZOUMI A., YEH A., AND TROMBERG B.J. 2002. Imaging cells and extracellular matrix *in vivo* by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**:11014–11019

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Wandaufbau des Dünndarms.....	5
Abbildung 1.2 Dünndarmschleimhaut.....	7
Abbildung 1.3 Peyer-Plaques .....	14
Abbildung 3.1 Bestimmung der planen Darmfläche .....	22
Abbildung 3.2 Jablonski-Diagramm der Ein- und Zwei-Photonen-Anregung .....	26
Abbildung 3.3 Versuchsaufbau zur Untersuchung der murinen Dünndarmschleimhaut....	32
Abbildung 3.4 Experimentelles Setup der Zwei-Photonen-Mikroskopie .....	34
Abbildung 4.1 Durchlichtaufnahmen basaler Zottenquerschnitte.....	41
Abbildung 4.2 Längsschnitte der Zotten .....	42
Abbildung 4.3 Morphometrie der Mikrovilli .....	45
Abbildung 4.4 Autofluoreszenz-basierte Übersichtsaufnahme einer Zotte.....	48
Abbildung 4.5 Optische Schnitte durch das lebende Zottenepithel.....	49
Abbildung 4.6 Gegenüberstellung von Zwei-Photonen-Mikroskopie und TEM .....	52
Abbildung 4.7 3D-Ansicht der lebenden Dünndarmschleimhaut .....	53
Abbildung 4.8 Zusammensetzung des intestinalen Zottenepithels .....	55
Abbildung 4.9 Dynamik unmarkierter IEL .....	57
Abbildung 4.10 Lokalisation der IEL im epithelialen Zellzwischenraum .....	59
Abbildung 4.11 Laser-induzierte, phototoxische Wirkung .....	61
Abbildung 4.12 Migrationsverhalten der IEL .....	62
Abbildung 4.13 Mittlere momentane Geschwindigkeit und Häufigkeitsverteilung.....	64
Abbildung 4.14 Einzelzell-Geschwindigkeit.....	65
Abbildung 4.15 Zusammenhang zwischen Zottenstandort und Geschwindigkeit .....	67
Abbildung 4.16 Einfluss der Sauerstoffsättigung auf die Geschwindigkeit.....	68
Abbildung 4.17 Einzelzell-Geschwindigkeit bei verringerter Sauerstoffsättigung.....	69
Abbildung 4.18 Migrationsverhalten der IEL bei Sauerstoffminderversorgung.....	71
Abbildung 4.19 Einfluss der Sauerstoffminderversorgung auf die Geschwindigkeit .....	72
Abbildung 4.20 Geschwindigkeit zu Beginn der Sauerstoffminderversorgung.....	73

Abbildung 4.21 Geschwindigkeit im Anschluss an die Sauerstoffminderversorgung.....	74
Abbildung 4.22 Migrationsmuster der IEL .....	76
Abbildung 4.23 Zusammenhang zwischen mittlerer Abweichung und Zeit.....	78
Abbildung 4.24 Amöboide Gestaltänderungen eines CD103 <sup>+</sup> -markierten IEL .....	80
Abbildung 4.25 Lymphozyt-Epithelzell-Membrankontakte .....	83
Abbildung 4.26 Fortsatz eines CD103 <sup>+</sup> IEL in die Lamina propria .....	84
Abbildung 4.27 Fortsatz eines CD103 <sup>+</sup> Lymphozyts in das Epithel .....	85
Abbildung 4.28 Durchtritt aus dem Epithel in die Lamina propria.....	86
Abbildung 4.29 Durchtritt aus der Lamina propria in das Epithel .....	86
Abbildung 4.30 Kontakthäufigkeit zwischen IEL und Epithelzellen.....	88

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1 Stereologische Parameter intestinaler Zotten .....	44
Tabelle 4.2 Stereologische Parameter intestinaler Mikrovilli .....	46

## 7.3 Filmverzeichnis

Diese Arbeit enthält verschiedene, durch die Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie aufgezeichnete 3D-Bildstapel und -Zeitserien. Einige der dargestellten Bildserien sind als Movies im avi-Format auf der beiliegenden CD-ROM hinterlegt. Auf die Filmsequenzen ist an entsprechender Stelle im Text verwiesen. Die Nummerierung der Movies entspricht dabei der Nummerierung der jeweiligen Abbildung, so gehört Movie 4.5 beispielsweise zu Abbildung 4.5. Die Dateien auf der CD-ROM sind nach der zugehörigen Abbildung benannt und nachfolgend aufgelistet.

Movie 4.5 3D-Ansicht des Zottenepithels und angrenzender Lamina propria.....	49
Movie 4.5 Optische Schnitte durch Zottenepithel und Lamina propria .....	49
Movie 4.9 Dynamik unmarkierter IEL .....	57
Movie 4.12 Migrationsverhalten der IEL .....	62
Movie 4.18 Migrationsverhalten der IEL bei Sauerstoffminderversorgung .....	71
Movie 4.24 Amöboide Gestaltänderungen eines CD103 <sup>+</sup> -markierten IEL.....	80
Movie 4.25 Lymphozyt-Epithelzell-Membrankontakte .....	83

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich während der vergangenen Jahre unterstützt und maßgeblich zu einem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran bedanke ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Andreas Gebert, für die umfassende Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Seine fachliche, hilfsbereite und umsichtige Unterstützung, ansteckende Begeisterung für die Möglichkeiten der Intravitalmikroskopie sowie seine eingebrachten konstruktiv-kritischen Anregungen haben meiner Arbeit stets neue Impulse verliehen.

Bei OA Dr. Oehring bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Etablierung morphometrischer Untersuchungsmethoden sowie für die sorgfältige Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate und Aufnahmen.

Dr. Torsten Bölke danke ich für die Algorithmen-basierte Vorverarbeitung der Datensätze.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Peter Schlattmann danke ich für seine Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Dr. Jan Richter möchte ich für seine fachlichen Anregungen, Aufheiterungen in Zeiten kleinerer Sinnkrisen sowie für seine stetige Hilfsbereitschaft bei aufgetretenen Fragen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und Schwiegereltern, für ihren unermüdlichen Zuspruch, moralischen Beistand und menschlichen Halt. Vor allem meiner lieben Freundin, Susann Gühne, danke ich von Herzen für ihr liebevolles Verständnis, ihre entgegengebrachte Geduld und Zuversicht sowie bedingungslose Unterstützung, mit der sie mich während dieser Zeit begleitet hat. Ihre Unterstützung ist in Worten kaum auszudrücken.

## **EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich Prof. Dr. Andreas Gebert und OA Dr. Oehring bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und,

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 9. August 2018

Tobias Fischer